

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANDREZA FABIANA BEGNAMI

FARMACÊUTICA FARMACÓLOGA

**Avaliação do Potencial Antimicrobiano *in vitro* de
Coriandrum sativum L. em diferentes espécies de *Candida*.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia - Área de Farmacologia,
Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Dra Vera L. G. Rehder

PIRACICABA

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

B394a

Begnami, Andreza Fabiana.

Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* de *Coriandrum sativum* L. em diferentes espécies de *Candida*. / Andreza Fabiana Begnami. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.

Orientador: Vera Lúcia Garcia Rehder.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Óleo essencial. 2. Antimicrobianos. I. Rehder, Vera Lucia Garcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Evaluation of the antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different species of *Candida*

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Essential oil. 2. Antimicrobial

Área de Concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Vera Lúcia Garcia Rehder, Gilson César Nobre Franco, Marili Villa Nova Rodrigues

Data da Defesa: 03-03-2008

Programa de Pós-Graduação em Odontologia




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 03 de Março de 2008, considerou a candidata ANDREZA FABIANA BEGNAMI aprovada.


PROFa. DRa. VERA LÚCIA GARCIA REHDER


PROF. DR. GILSON CÉSAR NOBRE FRANCO


PROFa. DRa. MARILI VILLA NOVA RODRIGUES

Dedicatória

A Deus por me fazer enxergar que sempre há um caminho para superar as dificuldades. E por toda a felicidade de vencer mais uma etapa de minha vida!

Aos meus queridos pais, **José Arnaldo e Januária**, em reconhecimento ao esforço e dedicação em favor da minha educação. Vocês são meus eternos orientadores!

A minha filha **Natália**, o maior orgulho da minha vida, pela compreensão dos momentos ausentes e por ser minha razão de viver e de vencer cada obstáculo da vida!

Ao meu irmão **Frei Arnaldo**, por todos os momentos de alegria em família e principalmente pelo companheirismo, pelos conselhos sábios e apoio.

Ao **Heitor J. Conrado**, pelo incentivo, paciência, companheirismo e por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis.

Dedico a vocês, com todo o meu amor!

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, minha gratidão por todos esses anos de oportunidade, orientação e amizade, exemplo de professora, pesquisadora e seriedade.

À Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte pela orientação profissional e pessoal, pelos ensinamentos a mim dedicados durante a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Adilson Saroratto, Dra. Mary Ann Foglio, Dra. Carmem Queiroga, Dra. Lara Durães Sete, Dra. Glyn Mara Figueira, membros da banca de qualificação, pelas sugestões para a realização e finalização deste projeto.

À Dra. Marili Villa Nova Rodrigues que com as revisões, discussões e sugestões contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco, pela grande amizade consolidada desde o tempo que éramos colegas de turma do curso de Especialização em Farmacologia, pela orientação para o exame de seleção do mestrado, pelo companheirismo e principalmente pela paciência. Minha gratidão, admiração profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Volpato, Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, Prof. Dr. Eduardo Hebling e Prof. Dr. Fábio Mialhe, obrigado pela orientação e disponibilidade. Agradeço pelos ensinamentos, pela confiança e principalmente pela amizade.

À Srta Maria Elisa dos Santos e a Sra Eliane Melo Franco pelo auxílio em todas as horas, disponibilidade, dedicação, carinho e colaboração.

As amigas Márcia, Ivy e Raquel que sempre foram grandes companheiras, amigas de todas as horas e que sempre terei imenso carinho.

As minhas amigas farmacêuticas Karina e Cristiane, pelo companheirismo, paciência, disponibilidade, sempre me ouvindo com paciência, me orientando sobre seminários, exame de doutorado, tirando duvidas e pela grande amizade consolidada nesta fase da vida tão especial!

Aos colegas que estão ou já passaram pela área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica e com quem tive o prazer de conviver: Myrella, Bruno, Ivy, Luciana, Cristiane, Karina, Michelle, Alcides, Humberto, Fernando, Luciana, Dani, Sidney, Paulo, Márcia, Regiane e Ramiro. Agradeço pela união, pelos momentos de descontração, pela ajuda nos trabalhos e por tornarem os dias mais alegres.

À Adriana, querida amiga e profissional, pelos conhecimentos transmitidos, paciência, apoio e amizade dedicada durante esta jornada.

À estagiária Daiane, querida amiga e companheira de longa jornada no CPQBA, pelo companheirismo, grande amizade, dedicação e sinceridade.

À todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, e que torcem e vibram pelo meu sucesso, meu sincero agradecimento!

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), na pessoa do diretor **Prof. Dr. Francisco Haitter Neto**.

Ao coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Prof. Dr. Mário Alexandre Coêlho Sinhoreti**.

À **Profª. Drª. Fernanda Klein Marcondes**, chefe do departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À **Profª. Drª. Cláudia Herrera Tambeli**, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**, coordenador da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Ao **CNPq**, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio à pesquisa para o desenvolvimento dos trabalhos.

À **Srª. Érica Alessandra Sinhoreti** e a **Srª. Raquel Quintana Sachi**, membros da Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pela solicitude e presteza de seus serviços.

“A mente que se abre a uma idéia jamais voltará a seu tamanho normal”.

Albert Einstein

RESUMO

O *Coriandrum sativum* L. conhecido popularmente como coentro é citado como antidiabético, antiinflamatório, hipoglicemiante e antibacteriano. O gênero *Candida* faz parte da microbiota da cavidade oral e sob circunstâncias especiais produzem candidíase e infecções sistêmicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade do óleo essencial (OE), extratos hexânico (EHE) e hidroalcoólico (EHA) de folhas de *C. sativum* frente as diferentes espécies de *Candida* e identificar seus principais constituintes. Para obtenção dos EHE e EHA foram utilizadas 10g das folhas secas e moídas, originando-se 0,43 g do EHE e 2,34 g do EHA, com rendimentos de 4,3% e 24,3%, respectivamente. O OE (2,06 g - rendimento 0,03%) foi obtido por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger a partir de 7500 g de folhas frescas, sendo fracionado em coluna seca e originando sete frações (FOE) com diferentes polaridades, as quais foram analisadas por CCD e CG-EM. Os constituintes majoritários identificados do OE foram álcoois e aldeídos de cadeia linear: 1-decanol (24,17%), 2E-decenol (18,05%) e 2Z-dodecenol (17,55%). Os OE, EHE e EHA foram testados frente as diferentes espécies de *Candida*: *C. albicans* CBS 562; *C. krusei* CBS 573; *C. parapsilosis* CBS 604; *C. dubliniensis* CBS 7987 e *C. tropicalis* CBS 94. As amostras do OE e extratos foram solubilizadas em água destilada e tween 1% para concentração em solução de 4 mg/mL, testando-se concentrações de 1000 µg/mL a 15,6µg/mL. O OE apresentou forte inibição frente as diferentes espécies de *Candida* com MICs de 125 a 500 µg/mL, enquanto os EHE e EHA inibiram apenas *C. parapsilosis* com MIC de 250 µg/mL. As frações 4, 5 e 6 do OE enriquecidas em álcoois apresentaram forte inibição e amplo espectro antimicrobiano, com MICs de 7 a 250 µg/mL, evidenciando que esses compostos são responsáveis pela atividade antimicrobiana frente as diferentes espécies de *Candida*, enquanto as frações FOE 1 a 3 ricas em aldeídos, com MICs de 31 a 1000 µg/mL, apresentaram atividade antimicrobiana moderada. Esses resultados demonstram o potencial uso de *Coriandrum sativum* no combate a leveduras do gênero *Candida*.

Palavras chaves: 1- Óleo essencial, 2- Antimicrobiano.

ABSTRACT

Coriandrum sativum L. (Umbelliferae / Apiaceae), known as coriander, is a popular cooking condiment in Brazil; it has been reported as an anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-bacterial agent. Different *Candida* spp., which might lead to complications such as skin candidosis or even systemic infections, are commonly found in the oral microbiota. The aim of this study was to evaluate the activity of the essential oil (EO) and hexanic and hydroalcoholic extracts of *C. sativum* against different species of *Candida*, as well as to identify their main constituents. To obtain the hexanic (HEE) and hydroalcoholic extracts (HAE), 10 g of dried leaves of *C. sativum* was used to attain 0.43 g of HEE and 2.34 g of HAE, with yields of 4.3% and 24.3%, respectively. Its essential oil (2.06 g — yield 0.03 %) was obtained by hydrodistillation using the Clevenger system where 7500 g of its fresh leaves and dry-column chromatography was used to fraction the oil into seven fractions with different polarities. These fractions were then analyzed by TLC and GC-MS. The main constituents identified in the essential oil were long-chain alcohols: 1-decanol (24.17 %); 2E-decenol (18.05 %); and 2Z-dodecenol (17,55 %) and aldehydes. The HEE, HAE, and EO were tested against *C. albicans* CBS 562, *C. krusei* CBS 573, *C. parapsilosis* CBS 604, *C. dubliniensis* CBS 7987, and *C. Tropicalis* CBS 94. Samples of EO, HEE and HAE were dissolved in distilled water with 1% tween to obtain a solution concentration of 4 mg/mL and 1000 µg/mL to 15.6 µg/mL of which was tested against *Candida* spp. The EO showed antibacterial activity against most species of *Candida*, with MICs ranging from 125 µg/mL to 500 µg/mL, while the extracts inhibited only *C. parapsilosis* with a MIC of 250 µg/mL. Alcohol-enriched fractions 4, 5 and 6 of EO showed strong inhibition and broad antimicrobial spectrum, with MICs ranging from 7 to 250 µg/mL, suggesting that alcohol might be responsible for the antimicrobial activity against the various species of *Candida* tested. While the fractions 1 to 3 rich in aldehydes, with MICs ranging from 31 to 1000 µg/mL, showed moderate antimicrobial activity against the species of *Candida* tested. Results showed potential antimicrobial activity of *Coriandrum sativum* against *Candida* spp (yeast infections).

Keywords: 1- Essential oil, 2- Antimicrobial.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1- Características Biológicas dos Fungos.	04
2.2- Características Biológicas do gênero <i>Candida</i> .	06
2.3- Espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> .	08
2.4- <i>Candida</i> e a cavidade oral.	10
2.5- Propriedades das Plantas Medicinais.	14
3- PROPOSIÇÃO	20
4- MATERIAL E MÉTODOS	21
5- RESULTADOS	26
6- DISCUSSÃO	39
7- CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

As plantas e substâncias de origem animal são utilizadas para fins curativos pela humanidade desde os tempos mais remotos. No decorrer da história os homens sempre tentaram aliviar o sofrimento das doenças ingerindo freqüentemente misturas de substâncias vegetais. A introdução da penicilina e das sulfonamidas na década de 1930 pode ser considerada como o marco do início da medicina moderna, como o escritor médico Lewis Thomas disse: "Os médicos podiam agora curar as doenças, e isto era espantoso, principalmente para os próprios médicos" (Blac, 2002).

Até meados do século XX, os medicamentos de origem vegetal constituíam a base da terapia medicamentosa, porém com o desenvolvimento da síntese orgânica, novos fármacos foram introduzidos rapidamente na terapêutica relegando às plantas um papel menor neste contexto. O cenário atual indica o renascimento das plantas medicinais como fonte de fármacos e de protótipos, ocorrendo um retorno ao uso de produtos naturais e medicamentos elaborados a partir deste material, o que se deve à escassez de descobertas de moléculas farmacologicamente ativas pelos processos químicos de síntese.

A investigação de plantas medicinais utilizadas popularmente resultou em alguns avanços terapêuticos e cerca de 50 % dos medicamentos utilizados são de origem sintética; 25 % são provenientes de plantas, isolados diretamente ou produzidos por semi-síntese a partir de um precursor vegetal e os 25 % restantes referem-se às outras fontes de produtos naturais como marinhos e microbiológicos (Calixto, 2000).

Com relação ao desenvolvimento de medicamentos, este contexto é particularmente importante uma vez que as plantas medicinais constituem uma rica fonte de novas moléculas a serem exploradas como novas drogas potenciais no futuro ou ainda como ferramentas bioquímicas para a elucidação de aspectos etiológicos de determinadas patologias que ainda permanecem obscuros (Lewis & Hanson, 1991; Cragg & Newman, 1999).

O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal tem aumentado significativamente e muitas empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisa nesta área. Na década de 70, nenhuma das 250 maiores companhias do ramo farmacêutico do mundo mantinham qualquer programa de

pesquisa na área de produtos naturais e atualmente, pelo menos metade delas introduziram este tipo de pesquisa como uma de suas prioridades (Fellows, 1995).

O mercado mundial de fitoterapia movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano. Em 2000 o setor faturou nos Estados Unidos US\$ 6,3 bilhões; na Europa foram US\$ 8,5 bilhões e no Brasil não há estatísticas oficiais, mas calcula-se que o faturamento esteja em torno dos US\$ 500 milhões. A previsão da Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos (ABIFITO) é de que em 2010 esse montante passe a ser US\$ 1 bilhão no país e empregue mais de 100 mil pessoas no setor (ABIFITO, 2007; SEBRAE, 2007).

O *Coriandrum sativum* L. (Umbelliferae/Apiaceae) tem sua origem provável no Mediterrâneo ou Ásia Menor sendo cultivado há mais de 3.000 anos. O seu uso é milenar sendo mencionado nos textos sânscrito, nos papiros egípcios e na Bíblia onde é citado como Manná, simbolizando as sementes de coentro. Foi levado para a Europa pelos romanos onde segundo a Bíblia, já o agregavam ao cominho e vinagre para conservar carnes. No Egito era colocado no túmulo dos nobres para ajudar a alma a encontrar o seu caminho e na Babilônia era utilizado para compor arranjos florais juntamente com pequenas rosas para decorar festas.

C. sativum é uma planta anual, de ciclo curto que atinge entre 15 a 50 cm de altura com folhas verdes e flores brancas e rosadas. Utilizam-se tanto os frutos secos moídos assim como a pimenta do reino; ou mesmo as folhas frescas, como a salsa.

De aroma e sabor intenso muito característico é muito empregado na culinária do norte e nordeste brasileiro chegando a substituir a salsa nos pratos do dia-a-dia, embora na região sudeste seja pouco apreciado.

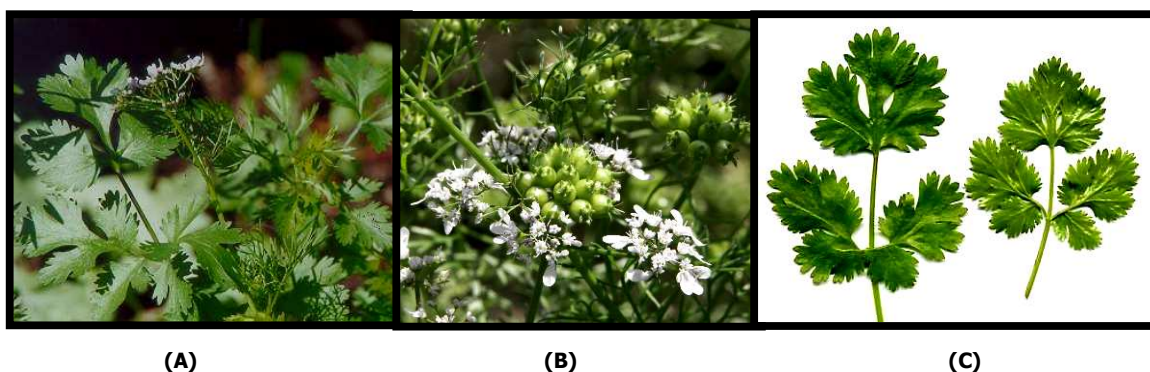


FIGURA 1- Foto de *C. sativum* (A), em florescimento (B) e folhas (C).

Fonte: Wikipedia, 2007.

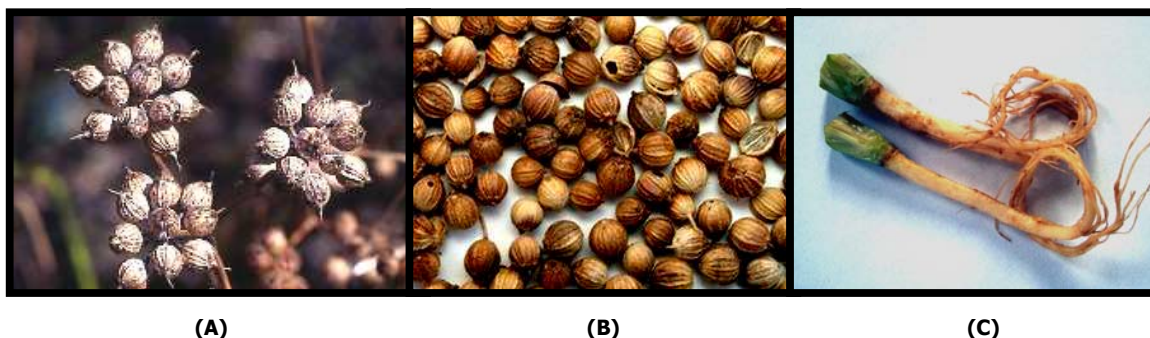


FIGURA 2 - Foto das sementes de *C. sativum* (A); condimentos (B) e raiz (C).

Fonte: Wikipedia, 2007.

Segundo Saeed & Tariq (2007) as sementes de *C. sativum* são ricas em terpenos como: alfa-pineno, linalol, cânfora, gerânio e limoneno. Enquanto Bandoni *et al.* (1998) relatam que os principais constituintes químicos do óleo essencial das sementes de *C. sativum* são aldeídos, destacando-se o 3E-hexenal e 2E-hexenal.

Em um trabalho realizado por Fan *et al.* (2002) foram isolados 13 compostos voláteis encontrados nas folhas frescas de *C. sativum*, sendo 11 aldeídos de cadeia linear.

De acordo com Lorenze & Matos (2002) *C. sativum* pode ser utilizado como carminativo, diurético, estimulante, afrodisíaco e empregado principalmente como moderador do apetite, contra ansiedade, nervosismo e problemas gastrointestinais.

C. sativum é considerado tanto uma planta medicinal quanto uma planta condimentar (especiaria) sendo tradicionalmente citado como antidiabético (Gray & Flat, 1999; Ootom *et al.*, 2006), antiinflamatório e hipolipidêmico (Chithra & Leelamma, 1997; Chithra & Leelamma, 2000; Lal *et al.* 2004); analgésico e sedativo (Emamghoreishi & Heidari-Hamedani, 2006; Chaudhry & Tariq, 2006); ansiolítico (Emamghoreishi *et al.* 2005); hipoglicemiante (Waheed *et al.* 2006) e carminativo, antiespasmódico e relaxante (Vedjani *et al.* 2006).

Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade do óleo essencial, extratos hexânico e hidroalcoólico das folhas de *Coriandrum sativum* frente as diferentes espécies de *Candida* e posteriormente identificar os constituintes majoritários.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Características Biológicas dos Fungos:

Os Fungos são seres unicelulares ou pluricelulares que habitam diversos ecossistemas, sendo enquadrados em três Reinos: o Reino Eumycota (Fungi ou fungos verdadeiros), Protozoa e Chromista (Hoog *et al.* 2000).

As espécies de fungos são classificadas em Filo (ou divisão) dentro do Reino ao qual pertencem, ou seja, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Metospópicos (Alexopoulos *et al.* 1996).

Os fungos podem ser distinguidos de outros organismos infecciosos como as bactérias ou os vírus porque são eucariotos. A parede celular e a membrana celular fúngicas são fundamentalmente diferentes das de bactérias e outros eucariotos, pois a parede celular fúngica é composta principalmente por quitina (um polímero de N-acetil glucosamina) em vez de peptideoglicana, e a membrana fúngica contém ergosterol em vez de colesterol que é encontrado nas células de mamíferos (Strohl *et al.* 2004).

Todos os fungos são heterotróficos, ou seja, obtêm seus nutrientes através da secreção de enzimas que tem por substrato a matéria orgânica do solo, plantas e animais (Slots & Taubman, 1992). Esses organismos assimilam o carbono pelo metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e álcoois, e o nitrogênio de compostos de sais de amônio, uréia, peptona e, dessa maneira acumulam glicogênio como material de reserva.

Os fungos não ingerem partículas alimentares da mesma forma que organismos como os protozoários, mas ao contrário, dependem do transporte de nutrientes solúveis através de suas membranas celulares e para obter esses nutrientes secretam enzimas degradativas (celulases, proteases, nucleases) no meio ambiente circundante (Höfling & Rosa, 1999).

Os fungos podem se apresentar como patógenos primários capazes de causar infecção sem fatores predisponentes ou como patógenos oportunistas, manifestando seu potencial patogênico em hospedeiros imunologicamente ou fisiologicamente comprometido.

A maioria dos fungos existe em uma das duas formas morfológicas básicas: (1) como fungo filamentoso (bolor) onde o corpo vegetativo, ou talo é tipicamente uma

massa de filamentos (hifas) com muitas ramificações (FIGURA 3) e na forma leveduriforme (2), formando população de células esféricas únicas, não-conectadas, de maneira semelhante a muitas bactérias apesar de serem cerca de 10 vezes maiores do que uma célula bacteriana típica (FIGURA 4).

Nos fungos filamentosos, dá-se o nome de micélio ao conjunto de hifas. O micélio cresce por ramificação e alongamento do ápice tornando-se densamente compactados, entrelaçados e com a aparência de um tecido coeso.

Algumas espécies de fungos são dimórficas, ou seja, se apresentam como leveduras em um ambiente e na forma filamentosa em outro (Strohl *et al.* 2004).

Muitos fungos se reproduzem tanto sexuada como assexuadamente, mas alguns apresentam apenas reprodução assexuada que está intimamente relacionada com a divisão celular miótica denominada brotamento (FIGURA 4) (Blac, 2002).

Nos ecossistemas os fungos são muito importantes, pois atuam como decompositores e recicladores da matéria orgânica e nas ciências da saúde contribuem pelo fato de serem produtores de compostos bioativos de interesse farmacológico como os antibióticos (pois excretam resíduos do seu metabolismo que são tóxicos para outros organismos e provavelmente auxiliam na competição e na sobrevivência das espécies que as produzem). Esses antibióticos quando extraídos e purificados são utilizados para o tratamento de infecções no homem (Blac, 2002).

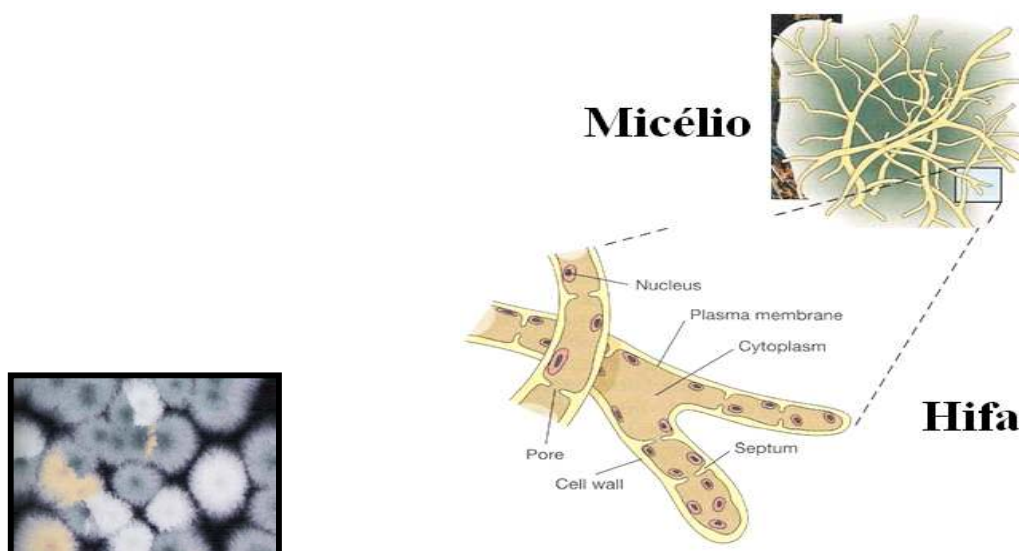


FIGURA 3 – Bolores, observação de uma colônia de fungos filamentosos e estrutura de Hifas.
Fonte: Blac, 2002.

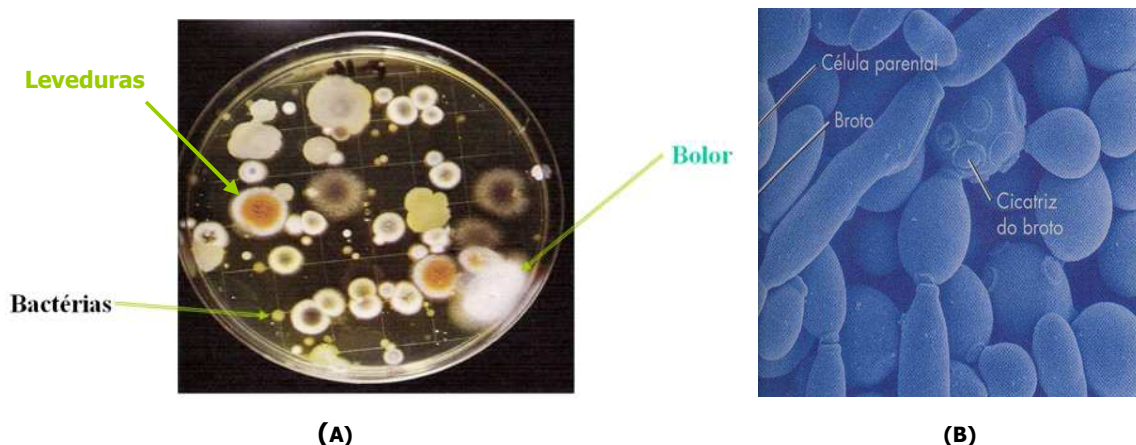


FIGURA 4 – Bolores e leveduras entre uma diversidade de outros microrganismos (A); Leveduras em diversos estágios de brotamento (B). Fonte: Tortora *et al.* 2005.

2.2 – Características Biológicas do gênero *Candida*:

As leveduras são fungos unicelulares de forma esférica, oval ou cilíndrica e a divisão celular geralmente ocorre por brotamento ou divisão binária. As leveduras do gênero *Candida* estão incluídas no Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes e Ordem Saccharomycetales (NCBI, 2007).

No processo de brotamento uma nova célula é formada como uma pequena protuberância da célula antiga, o broto recém-formado aumenta de tamanho e então se separa. Embora a maioria das leveduras reproduza-se apenas como células individuais, algumas leveduras podem formar filamentos sob certas condições, especialmente na *Candida albicans* onde determinadas características somente podem ser expressas pela forma filamentosa que é essencial para sua patogenicidade (Madigan, 2004).

O gênero *Candida* compreende mais de 150 espécies que crescem em temperaturas que variam entre 20°C a 38°C e em pH ácidos a pH alcalinos (Odds, 1998).

As diferentes espécies de *Candida* fazem parte da microbiota normal da pele, da cavidade bucal e do trato gastrointestinal além de secreções brônquicas e do trato geniturinário (Lacaz, 1980), vivendo como organismos comensais.

Entretanto, comportam-se como patógenos oportunistas produzindo infecções que vão desde lesões das mucosas superficiais (candidíase ou candidose) até disseminações sistêmicas graves. As infecções ocorrem quando a flora bacteriana

competidora é eliminada como, por exemplo, pelo uso de antibióticos antibacterianos, permitindo assim um crescimento exagerado dessas leveduras. Essa infecção aflige indivíduos debilitados e /ou imunocomprometidos e são raras em indivíduos normais.

O uso de drogas imunossupressoras para transplante de órgão, o uso de quimioterapia no tratamento do câncer e a alta frequência de indivíduos imunodeficientes devido à epidemia de AIDS resultaram na expansão significativa da população imunocomprometida, assim como no aumento da patogenicidade do gênero *Candida* (Koneman *et al.* 2001).

As infecções fúngicas representam aproximadamente 15 % de todas as infecções nosocomiais em unidades de tratamento intensivo nos Estados Unidos, com as espécies de *Candida* sendo os patógenos de ocorrência mais comum (Strohl *et al.* 2004).

A candidíase das mucosas pode afetar a cavidade oral, canal vaginal, traquéia, brônquios e o canal alimentar, causando esofagite, gastrite, enterite e doença perianal.

As infecções da pele (micoses oportunistas) podem envolver áreas intertriginosas úmidas, como os espaços interdigitais das mãos e dos pés, sulco submamário na mulher, axilas e pregas inguinais.

A infecção das unhas conhecida como onicomicose pode ser freqüente em trabalhadores em fabricas de conservas, cujas mãos ficam mergulhadas em água por longos períodos (Blac, 2002).

A candidíase vaginal (vaginite) apresenta-se como uma lesão vaginal branca grossa ou fina e ocorre quando as secreções vaginais apresentam grandes quantidades de açúcares. Essas alterações na secreção vaginal ocorrem durante a gravidez; quando são utilizados contraceptivos orais; quando o diabetes está descompensado ou quando ocorre o uso de roupas íntimas sintéticas e apertadas, que promovem calor e umidade, favorecendo assim o desenvolvimento da levedura. Mulheres HIV-positivas freqüentemente sofrem de candidíase vaginal recorrente (Rodrigues *et al.* 2007).

A candidíase mucocutânea crônica é uma infecção oportunista da pele e mucosa associada a vários defeitos genéticos, incluindo função leucocitária comprometida ou transtornos do sistema endócrino. Entre as doenças predisponentes mencionadas por Rippon (1988) encontram-se as displasias tímicas, com ou sem hipogamaglobulinemia, o hipoparatiroidismo e a doença granulomatosa crônica, esta última com alteração de mieloperoxidases dos fagócitos, que impede a morte das leveduras após fagocitose.

A candidíase do trato urinário é relativamente rara, aparece como cistite e causada mais comumente por *C. glabrata* ou pielonefrite, tanto ascendente a partir de infecção vesical quanto por disseminação hematogênica a partir de um foco de infecção distante (Fisher, 1982).

O baixo pH do meio também pode explicar incidência relativamente alta de candidíase na união gastroesofágica em pacientes com tumores hematológicos malignos. A candidíase esofágica pode ocorrer como extensão de candidíase orofaríngea, sobretudo em recém-nascidos (Gelfand *et al.* 1990).

A candidíase das meninges é uma condição rara produzida por disseminação a partir de focos de infecção localizados nos tratos respiratório e gastrointestinal ou a partir de êmbolo séptico deslocado de válvula cardíaca infectada (Gelfand *et al.* 1990).

A candidíase sistêmica é relativamente rara: é observada, sobretudo como evento terminal em pacientes com doenças debilitantes, neoplasias, imunossupressoras e após transplante de órgãos, em particular durante uma síndrome de rejeição aguda (Rodrigues *et al.* 2007).

Rippon (1988) cita cinco condições que predis põem à infecção por *C. albicans*: (1) pouca idade, ou seja, antes do estabelecimento da microbiota normal; (2) condições fisiológicas, como gravidez, disfunção endócrina e diabetes mellitus, (3) administração prolongada de antibióticos que altera a microbiota bacteriana; (4) debilidade, incluindo imunossupressão, particularmente AIDS e alterações na função leucocitária; e (5) solução de continuidade em barreiras corpóreas causadas por procedimentos cirúrgicos e inserção de cateter permanente.

2.3- Espécies de *Candida* não-*albicans*:

As espécies de *Candida* diferentes da *C. albicans* formam parte da microbiota normal de superfícies cutâneas e mucocutâneas, e apenas em raras ocasiões foram consideradas como agentes de doenças clínicas. Entretanto, várias espécies foram associadas à virtualmente todas as formas de candidíase, como demonstram numerosos trabalhos publicados na literatura médica recente (Xu *et al.* 1999; Mardegan, 2003; Barros, 2005).

Wingard (1995) em uma revisão de 1.591 casos de candidíase divulgados em 37 trabalhos entre 1952 e 1992, verificou que as espécies de *Candida* não-*albicans* haviam sido os agentes causais de 46 % das infecções sistêmicas, sendo *C. tropicalis* responsável por 25 % das infecções, *C. glabrata* por 8 %, *C. parapsilosis* por 7 % e *C. krusei* por 4% desse total. Verificaram também que pacientes com leucemia tinham maior probabilidade de adquirirem infecção por *C. albicans* ou *C. tropicalis* e os receptores de transplante de medula óssea, por *C. krusei* ou *C. lusitanae*.

Candido *et al.* (2000) avaliaram amostras de *Candida spp.* isoladas da cavidade bucal de pacientes com lesões bucais (candidose) quanto a produção das exoenzimas fosfolipases e proteinases e constataram que a atividade enzimática é um dos prováveis fatores de patogenicidade deste gênero.

A levedura *C. dubliniensis* pode ser negligenciada ou erroneamente identificada, pois compartilha de muitas características fenotípicas e bioquímicas com *C. albicans*, dificultando assim a diferenciação entre elas. Chavasco *et al.* (2006) utilizaram a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificar a possível presença de *C. dubliniensis* dentre as amostras isoladas sendo que essa técnica demonstrou-se útil, prática e com identificação taxonômica mais acurada.

A emergência de *C. dubliniensis* tem sido atribuída a importante redução da imunidade e/ou a terapêutica antifúngica que pode selecionar espécies menos sensíveis como *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Apesar desta possibilidade os estudos de susceptibilidade de *C. dubliniensis* têm revelado que inicialmente a grande maioria dos isolados é sensível ao fluconazol e a anfotericina B, embora 3% dos isolados tenham sido inicialmente resistentes ao fluconazol (Alves *et al.* 2000).

Várias causas vêm sendo propostas para explicar a súbita emergência de tantas espécies novas de leveduras como agentes infecciosos, entre as quais são citados o uso de antibióticos de amplo espectro, agentes antineoplásicos, Vancomicina, cateterismo endovenoso e o crescente número de pacientes com neutropenia e imunossupressão (Hazen, 1995).

Dados provenientes de alguns estudos sugerem que o uso maciço de fluconazol como tratamento prolongado ou intermitente modifica a prevalência de *C. albicans*, sendo o responsável pela relativa redução do isolamento de *C. albicans* em hemocultivos, em comparação com outras espécies de *Candida* (Persons *et al.* 1991; Millon *et al.* 1994).

Em um estudo para avaliar a susceptibilidade de cepas de *C. albicans* (isoladas de pacientes com estomatite protética) à cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B, foi demonstrado que a Anfotericina B possui ótima atividade fungicida em baixas concentrações, enquanto os azóis apresentaram apenas atividades fungistáticas e não fungicida (Batista *et al.* 1999).

A contaminação cruzada pelos profissionais dos hospitais também pode explicar o aumento de infecções causadas por leveduras nesse ambiente. Strausbaugh *et al.* (1994) demonstrou que 70 % das enfermeiras e das pessoas não pertencentes à equipe de enfermagem portavam leveduras nas mãos, sendo *C. parapsilosis* a mais prevalente.

2.4- *Candida* e a cavidade oral:

A cavidade oral humana tem sido considerada um ambiente único, por oferecer uma variedade de nichos ecológicos para colonização microbiana, inclusive para fungos pertencentes ao gênero *Candida* (Jabra-Rizk *et al.* 2001b).

A cavidade oral, ao contrário de outras cavidades corporais, está constantemente exposta aos estímulos mecânicos, térmicos e químicos em decorrência dos atos fisiológicos a ela inerentes, destacando-se a mastigação. Dessa forma, tornando susceptível a apresentar com frequência, modificações sistêmicas que poderão concorrer para o rompimento do equilíbrio biológico entre população microbiana e hospedeiro (Slots *et al.* 1989).

Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* habitam diversos epitélios do corpo incluindo a mucosa oral de aproximadamente 40 % da população adulta saudável fazendo parte da microbiota residente (McCullough *et al.* 1999).

A candidíase oral é a manifestação clínica mais freqüente em humanos, manifesta-se como manchas ou placas brancas elevadas na mucosa oral, na língua ou nas gengivas que podem coalescer para formar uma membrana nos casos mais graves (FIGURA 5).

As placas podem tornar-se confluentes e ulceradas e espalhar-se pela garganta. Muitos indivíduos HIV positivo eventualmente desenvolvem candidíase oral que não raro se espalha para o estômago. Essas placas ficam firmemente aderidas ao epitélio e, quando removidas, mostram uma base avermelhada e edematosa. O diagnóstico é clínico

e pode ser confirmatório por observação microscópica de pseudo-hifas e blastoconídios característicos em esfregaços de exsudato corados com Gram (Koneman *et al.* 2001).



FIGURA 5– Candidíase oral.

Fonte: Wikipedia, 2007.

A frequência e a predominância das espécies de *Candida* variam em função da idade do hospedeiro (Kleinegger *et al.* 1996). Durante o período neonatal, as condições que predispõe a instalação de leveduras são provavelmente a imaturidade do sistema imunológico e queratinização da microbiota oral (Okasaka, 1990).

Na infância, a prevalência de leveduras está associada ao uso de chupetas, irrompimento dos primeiros dentes, uso de mamadeira, lesões de cárie, deficiências nutricionais, higiene bucal deficiente, terapia antibacteriana, idade e sexo (Ollila *et al.* 1997). O aumento da colonização em idosos ocorre simultaneamente às alterações no ambiente bucal, em consequência da perda de elementos dentais, interações medicamentosas, uso de prótese e outros fatores (Odds, 1998)

Os grupos de riscos (que reporta maior prevalência de espécies de *Candida*) são compostos por portadores de síndrome de Down e Sjögren, portadores de hipofunção de glândulas salivares, diminuição do fluxo ou do pH salivar, portadores de diabetes mellitus, portadores de HIV-positivo e portadores de neoplasias malignas avançadas, onde a resposta imuno deficiente pode ser um fator preditivo para o desenvolvimento de candidose (Vargas & Joly, 2002).

O tratamento com radioterapia produz uma diminuição severa no fluxo salivar dentro das duas primeiras semanas de tratamento que pode quebrar o equilíbrio ecológico

da microbiota bucal, favorecendo o aparecimento de infecções e maior proliferação de microrganismos como *Streptococcus* do grupo *mutans* (em edentados) e *C. albicans*, tornando esses indivíduos também pertencentes ao grupo de risco (Spolidorio *et al.* 2001).

Em pacientes portadores de HIV-positivo as manifestações orais mais freqüentes são: candidíase, gengivite, periodontite, leucoplasia pilosa, herpes labial e sarcoma de Kaposi, sendo que os pacientes do sexo masculino são mais acometidos do que o sexo feminino (Souza *et al.* 2000).

As razões para o estabelecimento da candidose são decorrentes de fatores precipitadores tais como: desordens endócrinas, higiene oral deficiente, queda da imunidade do hospedeiro, lesões na mucosa, tratamento prolongado com antibióticos, corticosteróides e outros (Ramirez-Amador, 1997).

As diferentes espécies de *Candida* são encontradas em diversos sítios da cavidade bucal, como as superfícies mucosas do lábio e bochechas, línguas, tonsilas, lesões de cárie, lesões endodônticas e fazendo parte do biofilme, colonizando preferencialmente as superfícies já recobertas por uma camada de placa, coagregando-se a espécies bacterianas nela presentes, ou ainda, aderindo-se diretamente à película salivar (Arendorf & Walker, 1980).

Segundo Lamkim & Oppenheim (1993) a *Candida albicans* adere pouco às superfícies dentais limpas e a medida que se forma a película adquirida esse elemento aumenta, podendo colonizar o esmalte dos dentes e as superfícies radiculares, tanto através de adesão direta aos receptores da película (atuando como colonizador pioneiro) ou atuando indiretamente pela coagregação a outros microrganismos já aderidos ao biofilme dental (De-Repentigny *et al.* 2000).

Os biofilmes contendo *C.albicans* poderiam estar implicados não apenas na candidose da mucosa oral, mas também associadas ao desenvolvimento de cáries e na patogênese das doenças periodontais (Hagihara *et al.* 1998, Beighton *et al.* 1995, Nikawa *et al.*1998).

Jabra-Rizk *et al.* (2001a) isolaram 54 amostras de lesões periodontais de pacientes com HIV-positivo e nas identificações constataram 44 isolados positivos para *C. dubliniensis*; 07 isolados para *C. glabrata* e 02 isolados para *C. parapsilosis*. Moreira *et al.* (2002) isolaram em infecções bucais, *C. parapsilosis* (uma espécie de levedura raramente

isolada em infecções bucais e causadoras da candidíase atrófica crônica ou estomatite por dentadura), *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. stellatoidea*. Alves *et al.* (2000) relataram os três primeiros casos de isolamento de *C. dubliniensis* no Rio Grande do Sul, em pacientes com AIDS, mas sem lesões de candidíase oral.

Com relação à incidência de *C. dubliniensis*, os melhores dados disponíveis são os da população irlandesa, onde foi isolada da boca de 27 % de indivíduos HIV positivos e de 32 % de pacientes com AIDS e candidíase oral. Da cavidade oral de indivíduos sadios foi isolada 3 % e dos HIV negativos, mas com candidíase oral foi isolada 14,6 % (Sullivan *et al.* 1995, 1999; Sullivan & Coleman, 1998).

A partir de observações sobre variação individual e populacional na prevalência de *Candida* spp. constatou-se que nem todos os indivíduos abrigam leveduras na boca devido a existência de barreiras naturais nas superfícies mucosas e nos fluidos orgânicos, impedindo a colonização nestes indivíduos. Essas barreiras seriam dependentes de fatores relacionados à idade, gênero, tabagismo, dieta, medicamentos, condições sistêmicas, estado nutricional e imune do hospedeiro (Höfling *et al.* 2001).

O estado fisiológico dos indivíduos tem sido reconhecido como o fator etiológico primário no desenvolvimento das infecções fúngicas, mais que a patogenicidade intrínseca do microrganismo oportunista.

C. albicans é uma levedura comumente encontrada na população humana, além de ser considerada a espécie de maior importância odontológica pelo fato de ser o agente etiológico de grande parte das infecções fúngicas ocorridas na cavidade oral, sendo que sua ocorrência neste local representa 60 % a 85 % dos isolados. Essa levedura é capaz de residir em equilíbrio com a microbiota comensal de hospedeiros assintomáticos e imunocomprometidos.

Entretanto, apenas pequenas alterações nesse estado podem modificar o comportamento dessa espécie que passa a manifestar seu potencial de patogenicidade e assim de comensal inofensivo torna-se um patógeno agressivo (Hube & Naglik, 2001).

Devido ao dimorfismo a levedura *C. albicans* pode se apresentar sobre várias formas conforme suas variações adaptativas, sendo a forma de hifa a mais patogênica e a mais aderente em relação à célula leveduriforme. Dessa forma, a capacidade dessa espécie de formar tubos germinativos parece contribuir para sua patogenicidade, visto que

amostras de tecidos infectados no homem e nos animais, na maioria das vezes contém hifas, pseudos-hifas e células leveduriformes (Koneman *et al.* 2001).

Os mecanismos que determinam a patogenicidade do gênero *Candida* ainda não estão totalmente elucidados, envolvem as características próprias das cepas em questão, o estado imunológico do hospedeiro e assim como as condições locais dos sítios de infecção (Okasaka, 1990).

Em 1982, Ruchel relatou que os fatores de patogenicidade de *C. albicans* estão relacionados com a produção de hialuronidase, condroitina sulfatase, proteinase e fosfolipases, sendo que as mesmas podem atuar de maneira conjunta ou separada determinando assim a intensidade das infecções. As proteinases são capazes de hidrolizar peptídeos enquanto as fosfolipases hidrolisam os fosfolipídeos. Tendo como componente de membrana fosfolipídeos e proteínas, essas enzimas estão provavelmente envolvidas na ruptura da membrana celular do hospedeiro, processo que ocorre durante a invasão das células do hospedeiro, considerando assim a atividade enzimática um dos fatores de patogenicidade deste gênero.

2.5- Propriedades das Plantas Medicinais:

A atividade biológica de óleos essenciais e extratos de plantas têm sido objeto de intensa investigação científica. Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas no combate a diversos tipos de infecções pela medicina popular, uma vez que apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana, com inibição comprovada contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Hulin *et al.* 1998).

O óleo essencial (produto do metabolismo secundário de muitas plantas) possui ação antimicrobiana que atua como defesa química contra doenças patogênicas, evidenciando que a grande maioria das plantas medicinais e aromáticas possuem resistência a patógenos incomuns (Simões *et al.* 2005).

As propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de diversas espécies vegetais tem sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas apenas recentemente foram cientificamente confirmadas (Jansen & Cheffer, 1987).

Extratos e óleos essenciais de várias espécies mostraram-se eficientes no controle do crescimento de fungos relacionados a infecções da pele (Adam *et al.* 1998), de bactérias patogênicas bucais (Cecanho *et al.* 1998, 1999) e de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Galli *et al.* 1985).

No combate a fungos, medicamentos contendo uma molécula originada a partir de síntese, semi-síntese ou biossíntese (microrganismos) são as principais armas disponíveis no mercado, no entanto, até hoje não existe uma terapia antifúngica ideal, ou os agentes empregados não são 100 % eficazes ou apresentam efeitos indesejáveis pelos pacientes (toxicidade, gosto ruim, etc).

Os fungos são eucariotos, aproximando-se estrutural, fisiológica e bioquimicamente de nossa constituição celular eucariótica e esta semelhança torna problemático utilizar qualquer forma paliativa ou curativa, principalmente através do uso de fármacos (Sheehan & Hitchcock, 1999), enquanto os medicamentos de origem vegetal apresentam a vantagem de suas moléculas atuarem em sinergismo (Calixto, 1998).

As informações disponíveis sobre plantas medicinais ativas contra a levedura *Candida albicans* não resultaram até o momento em fitofármacos para uso humano ou animal, exceto algumas patentes utilizando material derivado de plantas da família do *Allium* (Plummer, 1992), de *Radix gentianae* (Chen, 1996) e alguns extratos estudados por Lee *et al.* (2003).

Recentemente, vários grupos de pesquisadores de diferentes localidades têm estudado a inibição de *C. albicans* por extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas de plantas. Na Índia, África e na América Latina, vários autores iniciaram seus trabalhos a partir de levantamento etnofarmacológico, que descrevem as espécies freqüentemente utilizadas pela população.

Alguns países da América Latina têm mantido programas de pesquisa para triagem de plantas medicinais com atividade antimicrobiana, como é o caso de Cuba (Martinez *et al.* 1996), Honduras (Lentz *et al.* 1998) e México (Shale *et al.* 1999), além de regulamentarem através da criação de banco de dados para que haja uma preservação do conhecimento.

A incidência de infecções nosocomiais causadas por microrganismos oportunistas (principalmente espécies de *Candida*) tem se tornado alarmante e de difícil tratamento devido a resistência a múltiplas drogas desenvolvidas pelos patógenos. As mãos dos

profissionais pertencentes ao corpo clínico dos hospitais são as fontes primárias de transmissão desses patógenos multi-resistentes e infecções para os pacientes.

Hammer *et al.* (1998) em um estudo de determinação da atividade anticandida *in vitro* de 24 óleos essenciais, revelaram que o óleo essencial de *C. sativum* possui atividade contra diferentes espécies de *Candida*, sugerindo seu uso em tratamentos tópicos para infecção superficial por *Candida*.

Bonjar *et al.* (2004) produziram extratos etanólicos de 221 espécies de 98 famílias de plantas medicinais cujo uso era tradicional pela medicina popular na região Sul do Irã e testaram suas atividades antibacterianas e antifúngicas sobre 11 espécies de bactérias e 3 espécies de fungos, incluindo *C. albicans* PTCC No. 5027 e *C. utilis* PTCC 5065 as quais não sofreram interferências em seu desenvolvimento pelo extrato etanólico de *C. sativum*, no entanto Chao *et al.* (2000) demonstraram em seu estudo que o óleo de *C. sativum* é um forte inibidor de bactérias Gram positivas e fungos.

Cantore *et al.* (2004) extraíram o óleo essencial das sementes de *C. sativum* e realizaram ensaios *in vitro* para atividade antibacteriana sobre 27 espécies de bactérias fitopatogênicas e verificaram que o óleo de *C. sativum* possui atividade antibacteriana significativa. Essas características do óleo essencial e de seus componentes sugeriram seu uso como bactericidas naturais para controle de doenças fitopatogênicas, no tratamento de sementes, frutos, na agricultura orgânica e também na indústria de alimentos como conservantes.

Mondal & Kolhapure (2004) constataram a eficácia e segurança de um produto sanitizante utilizado para a assepsia das mãos e desinfecção de objetos inanimado, composto apenas de plantas medicinais entre elas *Coriandrum sativum* atuando como antibacteriano, concluindo que esse produto possui um significativo efeito bacteriostático sobre as bactérias presentes nas superfícies das mãos e objetos inanimados devido ao sinergismo de seus compostos medicinais (Ravikumar & Kolhapure, 2005).

A atividade antioxidante de extratos etanólico, aquoso e etéreo de *C. sativum* foi analisada Melo *et al.* (2003) que detectaram a presença de compostos fenólicos nos dois primeiros extratos e a presença de carotenóides no etéreo. Os resultados permitiram considerar os extratos aquoso e etéreo de coentro como antioxidantes em potencial. O extrato aquoso, por exibir maior atividade antioxidante e não utilizar solventes tóxicos

para a sua obtenção apresenta-se como uma alternativa para ser utilizado em alimentos (Ramalho & Jorge, 2006).

A presença de micotoxinas em alimentos tem sido correlacionada a várias patologias humanas e as autoridades de saúde no mundo todo têm implementado ações para diminuir a ingestão desses compostos pela dieta. Lino *et al.* (2006) realizaram um trabalho para analisar os níveis de ocratoxina A em *C. sativum* comercializado no mercado de Portugal devido ao seu grande consumo na culinária tradicional portuguesa. Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada a presença da micotoxina, demonstrando o potencial antimicrobiano de seus constituintes, sendo considerado, portanto seguro o *Coriandrum sativum* consumido no mercado de Portugal.

É notável e constante o aumento de pesquisas para encontrar um componente alternativo e eficiente para a conservação de alimentos, objetivando a substituição total ou parcial dos aditivos antimicrobianos químicos sendo que as plantas condimentares (especiarias) oferecem uma alternativa promissora e segura para a produção de alimentos microbiologicamente estáveis.

Mas essa alternativa é limitada devido a fatores como: sabor, aroma e gosto, pois as doses antimicrobianas efetivas excedem o nível organolepticamente aceito (Souza, *et al.*, 2005), requerendo futuras investigações.

Al-Jedah *et al.* (2000) conduziram um estudo para analisar a ação de especiarias combinadas, incluindo *C. sativum* sobre bactérias, leveduras, fungos filamentosos e a síntese de toxinas. Verificaram que essa combinação de especiarias exerceu efeito bacteriostático sobre todos os ensaios, justificando o seu uso popularmente como condimento e conservante alimentar.

Estudos de determinação da Concentração Mínima Inibitória – MIC, de óleos essenciais e extratos de mais de 40 espécies de plantas medicinais têm sido desenvolvidos no CPQBA/UNICAMP (Projeto FAPESP - Proc. 01/09081-6: "Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Cultivadas na Região de Campinas, SP"), e revelaram que os óleos essenciais com maior potencial atividade antifúngica para *C. albicans* foram os das folhas do *C. sativum* L. e do *Allium tuberosum* (Duarte *et al.* 2005).

Elgayyar *et al.* (2001) verificaram a eficácia do óleo essencial extraído das sementes de *C. sativum* contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. O óleo de *C. sativum* inibiu completamente o crescimento de *Staphylococcus aureus* e fungos

como *Aspergillus niger* e *Rhodotorula*, sendo menos efetivo na inibição contra bactérias Gram negativas como *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*. Apresentando também atividade inibitória moderada contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A investigação da atividade do óleo essencial de duas variedades de *C. sativum* foi testada contra microrganismos envolvidos com patologias dérmicas e verificou-se que ambos apresentaram atividade para *Pityrosporum ovale* (Duarte *et al.* 2007).

Telci *et al.* (2006) realizaram um estudo sobre a diferença na composição química do óleo essencial extraído das sementes de duas variedades de *C. sativum* cultivados em duas localidades distintas e verificou que fatores como práticas de cultivo, condições ambientais e sazonalidade influenciam quali e quantitativamente na composição de seus constituintes.

Nas folhas frescas de *C. sativum* foram identificadas 13 compostos voláteis majoritários, onde 11 desses são aldeídos acíclicos e típicos produtos da clivagem oxidativa dos ácidos graxos insaturados, incluindo decanal, 2E-decenal, 2E-dodecenal, nonano, linalol, tetradecanal, 2E-undecenal, dodecanal, 2E-tridecanal, octanal, undecanal, nonanal e 2E-hexenal em ordem decrescente. Sendo os mais abundantes: decanal, 2E-decenal e 2E-dodecenal, representando mais de 85 % dos compostos identificados (Fan *et al.* 2002; Kubo *et al.* 2004).

Os compostos alifáticos 2E-alcenal e alcanal característicos das folhas frescas de *C. sativum* possuem atividade bactericida contra *Salmonella choleraesuis* ATCC 35640, enquanto 2E-dodecenal é o mais efetivo contra bactérias latentes alimentares, seguido de 2E-undecenal (Kubo *et al.* 2004, Kubo & Fujita, 2001).

Os compostos 2E-undecenal e 2E-decenal mostraram também atividade antifúngica contra *Saccharomices cerevisiae* ATCC 7754 (Kubo *et al.* 2003).

O composto 2E-hexenal é encontrado em diversas espécies de plantas e possui um amplo espectro antimicrobiano, no entanto o mecanismo de ação antimicrobiana desse alcenal não está elucidado (Kubo *et al.* 2004).

Deng *et al.* (2003) relataram os principais constituintes voláteis das folhas e raízes do *C. sativum* de uma espécie chinesa, obtidos por microextração em fase sólida. Foram identificados 15 compostos sendo os majoritários decanal, 2-decenal, 1-decanol, 2E-decenol, 2E-decenal e 2E-tridecenal. Também foram encontrados outros compostos

voláteis em baixa concentração, destacando-se aldeídos alcoólicos, os quais são responsáveis pela fragrância agradável e suave do *C. sativum* utilizado como condimento.

Ramadan & Mörsel (2002) relatam que os principais constituintes do óleo bruto das sementes de *C. sativum* obtidos por extração em Soxhlet são lipídios, sendo o ácido graxo petroselinico o majoritário e seguido do ácido linoléico, representando assim uma boa fonte de fitosterol.

Chaudhry & Tariq (2006) testaram o potencial antibacteriano de uma decocção de *C. sativum* contra 176 bactérias isoladas da cavidade oral de 200 pacientes e verificou que não houve efeito antibacteriano contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas testadas.

Saeed & Tariq (2007) também testaram o potencial antibacteriano de duas preparações aquosas: decocção e infusão de *C. sativum* contra 345 bactérias Gram negativas isoladas do sistema urinário. Verificaram que todas as bactérias testadas apresentaram resistência a ambos extratos.

De modo análogo, Khallil (2001) relatou que o extrato aquoso de *C. sativum* não possui atividade contra os esporos germinativos e nem contra o crescimento vegetativo de duas espécies patogênicas.

3- PROPOSIÇÃO

Considerando os resultados promissores obtidos nos ensaios preliminares com o óleo essencial das folhas de *C. sativum* contra a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 desenvolvidos no CPQBA/ UNICAMP e a carência de informações na literatura sobre as atividades antifúngicas do óleo essencial e extratos das folhas de *C. sativum* L.

O presente trabalho teve como objetivos:

- ✓ Obtenção do óleo essencial (OE) dos extratos hexânico (EHE) e hidroalcoólico (EHA) das folhas do *C. sativum*.
- ✓ Avaliação química dos constituintes presentes nos OE, EHE, EHA por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM),
- ✓ Avaliação da atividade antifúngica destes para *C. albicans* CBS 562; *C. tropicalis* CDS 94; *C. parapsilosis* CBS 604; *C. dubliniensis* CBS 7987 e *C. krusei* CBS 573.
- ✓ Fracionamento do óleo essencial por métodos cromatográficos,
- ✓ Avaliação da atividade antifúngica das frações do óleo essencial,
- ✓ Identificação dos constituintes químicos ativos das Frações do óleo essencial (FOE)
- ✓ Correlação dos resultados obtidos com a estrutura dos constituintes químicos presentes.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Obtenção do Material Vegetal:

Coriandrum sativum L. foi adquirido no comércio regional (Ceasa - Campinas) em 03 de janeiro de 2007.

Para a obtenção do OE foram utilizadas folhas frescas e para obtenção dos EHE e EHA foram utilizadas folhas secas e moídas.

4.2- Metodologia aplicada ao estudo Fitoquímico:

4.2.1- Obtenção do Óleo Essencial de *C. sativum*:

A extração do OE foi realizada por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, pesando-se 7500 g das partes aéreas da planta fresca (folhas e talos menores).

Esse material foi depositado em um balão de fundo redondo, adicionou-se 7500 mL de água destilada e procedeu-se à hidrodestilação durante 4 horas.

Após o término da extração os sistemas foram resfriados e as fases aquosas foram agrupadas e extraídas com diclorometano (3 x 50 mL).

A fase orgânica resultante foi submetida à secagem com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido a vácuo em evaporador rotativo, obtendo-se assim o OE de *C. sativum*.

O OE foi analisado por CCD e CG-EM e submetido aos ensaios de atividade antimicrobiana.

4.2.2- Obtenção dos EHE e EHA de *C. sativum*:

A partir das folhas secas e moídas de *C. sativum* foram preparados os extratos hexânico (EHE) e hidroalcoólico (EHA).

O material vegetal para a obtenção dos extratos foi seco em estufa (Fabbe, modelo 170) com ventilação à 40°C durante três dias e triturado em moinho de facas (marca Fabbi).

O EHE foi preparado a partir de 10 g de folhas secas e moídas com 100 mL de hexano em dispersor mecânico do tipo POLYTRON em temperatura ambiente durante 2 minutos.

Após filtração esse processo foi repetido mais uma vez e os extratos foram agrupados e secos em evaporador rotativo a vácuo, obtendo-se assim o EHE.

O EHA foi preparado a partir do resíduo da extração hexânica com 150 mL de solução etanol e água (80:20 v/v), de modo análogo ao EHE, obtendo-se o EHA.

Os EHE e EHA foram analisados por CCD e CG-EM e submetidos aos ensaios de atividade antimicrobiana.

4.2.3- Fracionamento do óleo essencial:

O OE por apresentar melhor atividade antimicrobiana foi fracionado em coluna seca.

Nesse procedimento foi utilizada uma membrana de celulose ($\varnothing = 1,5$ cm, 20 cm de altura) fornecida pela empresa Viskase.

A coluna foi lavada internamente e externamente com hexano e posteriormente com diclorometano, seca com ar comprimido, empacotada a seco com sílica gel 60 Merck (70-230 mesh). Após adição do OE, a coluna foi eluída com diclorometano e dividida em 7 partes de 3cm cada, denominadas frações do óleo essencial de 1 a 7 (FOE).

As FOE foram extraídas da sílica com diclorometano, filtradas em funil de placa porosa, evaporadas sob vácuo e analisadas por CCD para verificar o perfil de cada fração, seguido de análise por CG-EM e avaliação de atividade antimicrobiana.

4.3- Métodos Analíticos:

4.3.1- Cromatografia em Camada Delgada (CCD):

Os OE, EHE, EHA e Frações do OE foram analisados por CCD, utilizando-se cromatoplasmas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck.

Os eluentes utilizados foram: hexano: acetato etila (90:10 v/v), clorofórmio: metanol (80:20 v/ v) e diclorometano, sendo selecionados de acordo com as características do OE, EHE e EHA e com o tipo de separação desejada em cada amostra.

A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada UV – visível a 254 e 366 nm, seguida de revelação por pulverização com solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 50,0: 1,0: 0,5 v/v/v) ou solução NP (difenilboriloxietilamina 1 %) e aquecimento em estufa a 100°C por 5 minutos (Wagner & Bladt, 1995).

4.3.2- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM):

As análises foram realizadas no Cromatógrafo a Gás Hewlott-Packard 6890, equipado com detector seletivo de massas Hewlott-Packard 5975, coluna capilar de filme HP-5 (25 m de comprimento X 0,25 mm de diâmetro X 0,25 µm de espessura).

As condições de análise para o OE e suas frações foram:

- ✓ Temperatura do injetor: 220 °C
- ✓ Temperatura do detector: 250 °C
- ✓ Temperatura de coluna: 60 °C, 3 °C. min⁻¹, 240 °C
- ✓ Gás de arraste (He): 1,0 mL. min⁻¹
- ✓ Injeção split.

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos espectros de massas com dados da biblioteca NIST-05, co-injeção de padrões de hidrocarbonetos para cálculo do índice de retenção e dados descritos por Adams (1995).

4.4- Métodos Microbiológicos:

4.4.1- Determinação da Atividade Antimicrobiana de *C. sativum*:

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados na Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP, sob orientação da Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

O óleo essencial, extratos e frações de *C. sativum* foram investigados contra

diferentes espécies da levedura *Candida* gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Francisco Höfling do Departamento de Biologia Buco Dental – área de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP.

Foram estudadas as seguintes espécies: *C. albicans* CBS 562; *C. tropicalis* CDS 94; *C. parapsilosis* CBS 604; *C. dubliniensis* CBS 7987 e *C. krusei* CBS 573.

4.4.2 - Meios de cultura:

Meio para manutenção das leveduras: Ágar Sabouraud Dextrose, contendo (g/L): peptona, 10,0; glicose, 40,0; agar-agar, 15,0; água destilada q.s.p. 1000 mL.

As leveduras foram cultivadas periodicamente nesse meio, incubadas a 36 °C até crescimento e armazenadas sob refrigeração. Réplicas das culturas foram mantidas em criotubos com glicerol a - 70 °C.

O meio utilizado para testes de atividade antimicrobiana foi caldo RPMI 1640 (INLAB), contendo L-glutamina, sem bicarbonato.

4.4.3- Preparo e Esterilização do meio RPMI 1640:

Os materiais utilizados para o preparo do meio RPMI 1640 foram esterilizados em autoclave e secos em estufa a 45 °C, com antecedência. Para preparo do meio, 20 g de dextrose foram dissolvidos em 500 mL de água deionizada esterilizada. A seguir, o meio RPMI 1640 foi adicionado sob agitação constante, e o volume completado com água para 1000 mL.

Para esterilização, o meio foi filtrado em membrana Millipore (0,22 µm e 47 mm diâmetro) à vácuo, e o filtrado recolhido em frascos Schott estéreis, vedados com parafilm® e envolvidos por papel alumínio. O meio permaneceu em estufa 37 °C por 24 h para confirmação da esterilidade, através da observação de possíveis turvações. O meio foi então armazenado em geladeira e utilizado por um período de até 30 dias.

4.4.4- Avaliação da atividade anti-*Candida* das amostras de *C. sativum* pelo método da microdiluição (CLSI, 2002):

Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços, foram depositados 100 µL de caldo RPMI 1640, com exceção da coluna 12, utilizada para os controles.

Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50 µL do material vegetal a ser investigado, em solução com concentração de 4 mg/mL (uma substância diferente para cada número ou coluna). Em seguida, 100 µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente (1000 – 15,6 µg/mL) . Os 100 µL finais foram desprezados.

Uma suspensão de 100 µL das diferentes espécies de *Candida* de crescimento recente (24 h), cuja turvação foi comparada à escala de McFarland nº 0,5 e diluídos para concentração final de 10^3 células/mL foram adicionados. As placas foram seladas com parafilm® e incubadas por 24 h a 37 °C. A MIC (Concentração Mínima Inibitória) foi definida como a menor concentração do extrato ou óleo capaz de impedir o aparecimento de coloração amarela (o meio RPMI sofre alteração de cor, de rosa para amarelo quando ocorre crescimento microbiano).

Foram também incluídos nos testes controles dos antifúngicos fluconazol e nistatina, controle para confirmação da esterilidade do meio de cultura e controle do crescimento do microrganismo.

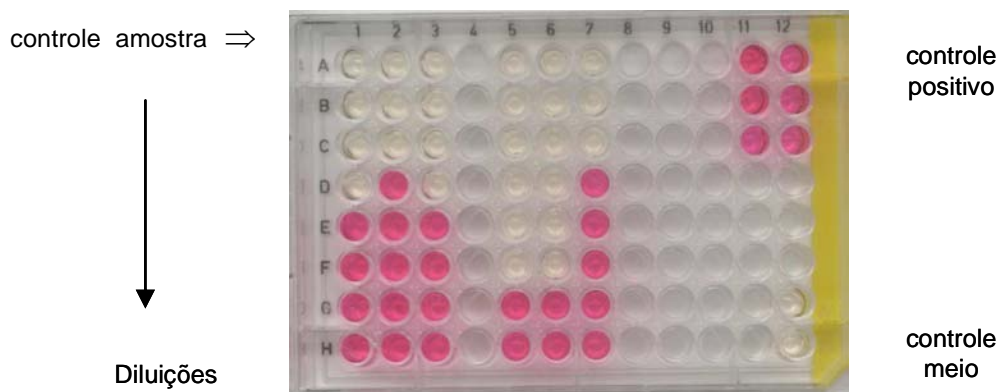


FIGURA 6– Ilustração do teste de atividade antimicrobiana através do método da microdiluição.

5 - Resultados:

5.1.- Obtenção do Óleo Essencial de *C. sativum*:

Para a obtenção do OE partiu-se de 7500 g de folhas frescas de *C. sativum* obtendo-se 2,06 g de OE, representando um rendimento de 0,03 % (massa fresca). O óleo apresentou coloração verde escuro e aroma levemente cítrico.

A determinação do Teor de Umidade do coentro resultou em 8 % da massa seca, representando 92 % de umidade, o que justifica o baixo rendimento do óleo essencial.

5.1.2. Análise do Óleo Essencial por CCD:

O óleo Essencial foi analisado por CCD utilizando diclorometano como eluente o que permitiu uma boa resolução conforme demonstrado na figura 7.



FIGURA 7: CCD do OE eluída com diclorometano e revelada com solução de anisaldeído.

5.1.3. - Avaliação da composição do OE por CG-EM:

A avaliação da composição química do OE foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Estes resultados são apresentados na tabela 1. Os constituintes foram identificados por comparação dos espectros de massas

com os da biblioteca espectral Nist-05, bem como por comparação dos dados de Índice de Retenção e espectros de massas da literatura (Adams, 2007), coletados em condições cromatográficas similares.

Tabela 01- Principais constituintes identificados no OE de *C. sativum*.

Óleo Essencial de <i>C. sativum</i>			
t_R min	M	% relativa	Composto
3,74	98	0,43	2-hexenal
3,82	100	10,34	3-hexenol
3,96	100	3,82	2-hexenol
4,56	128	1,41	nonano
10,54	196	0,55	Acetato de Linalol
14,79	156	4,76	n- decanal
17,07	98	1,01	2-ciclohexenol
17,60	156	18,05	2E-decenol
17,75	158	24,17	1-decanol
21,75	154	0,77	Octilciclopropano
23,23	184	3,02	n-dodecanal
25,53	182	2,88	2-dodecenal
25,86	184	17,55	2Z- dodecenol
25,91	168	1,11	ciclododecano
31,17	212	0,87	tetradecanal
33,47	212	3,10	2E-tetradecenol

Tempo de retenção (t_R), massa molar (M) e fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma (%).

Os principais constituintes do OE em termos de porcentagem da área são aldeídos e álcoois de cadeia linear que variam de 6 a 14 átomos de carbono, dentre os quais destacamos o 2E-decenol (18,05 %), 1-decanol (24,17 %) e 2Z-dodecenol (17,55 %). O cromatograma obtido por CG-EM está apresentado na Figura 8.

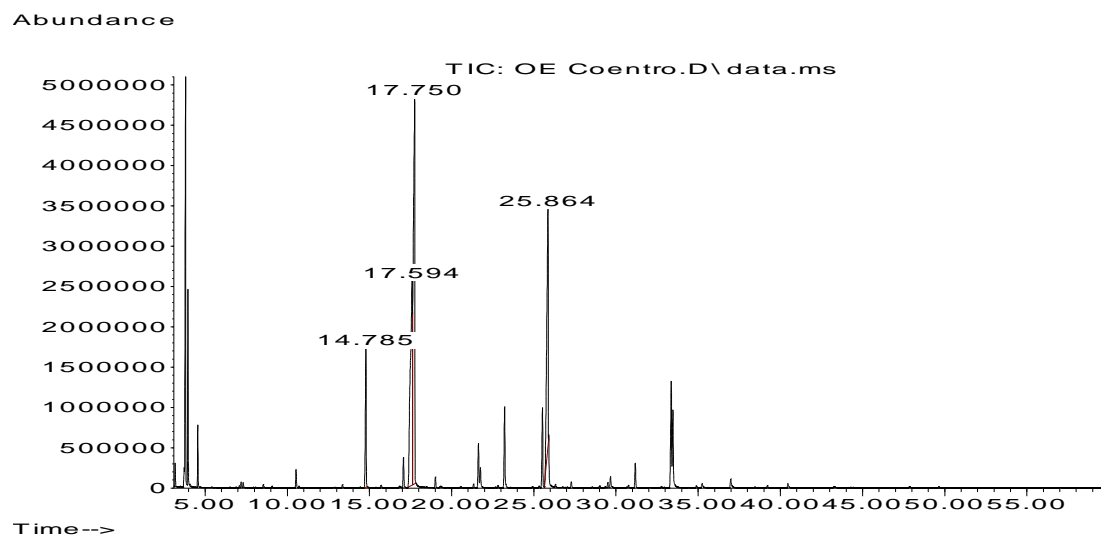


FIGURA 8- Cromatograma do OE obtido a partir de folhas frescas de *C. sativum*.

Os espectros de massas do 2E-decenol, 1-decanol, e 2Z-dodecenol, principais constituintes do OE estão apresentados nas figuras 9, 10 e 11, respectivamente.

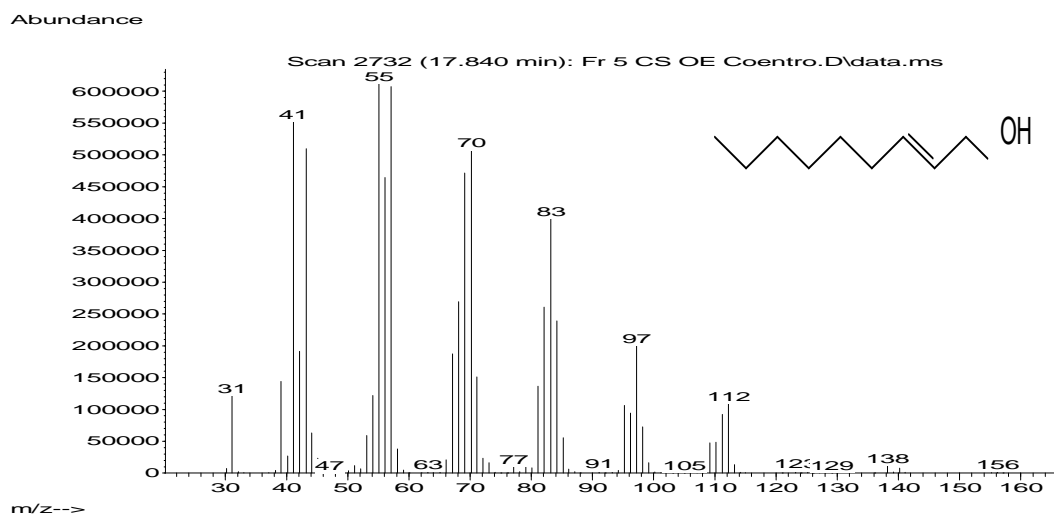


FIGURA 9: Espectro de massas do 2E-decenol ($C_{10}H_{20}O$; $M = 156$).

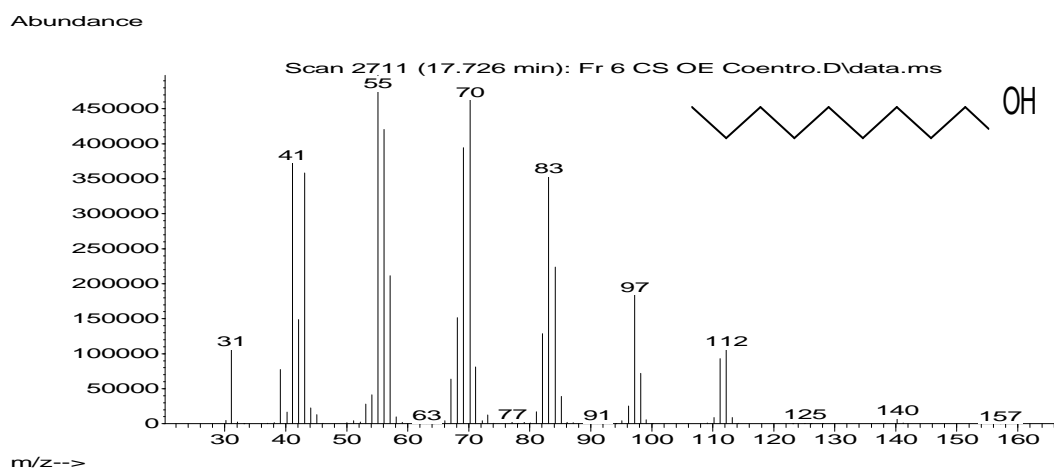


FIGURA 10: Espectro de massas do 1- decanol ($C_{10}H_{20}O$; $M = 158$).

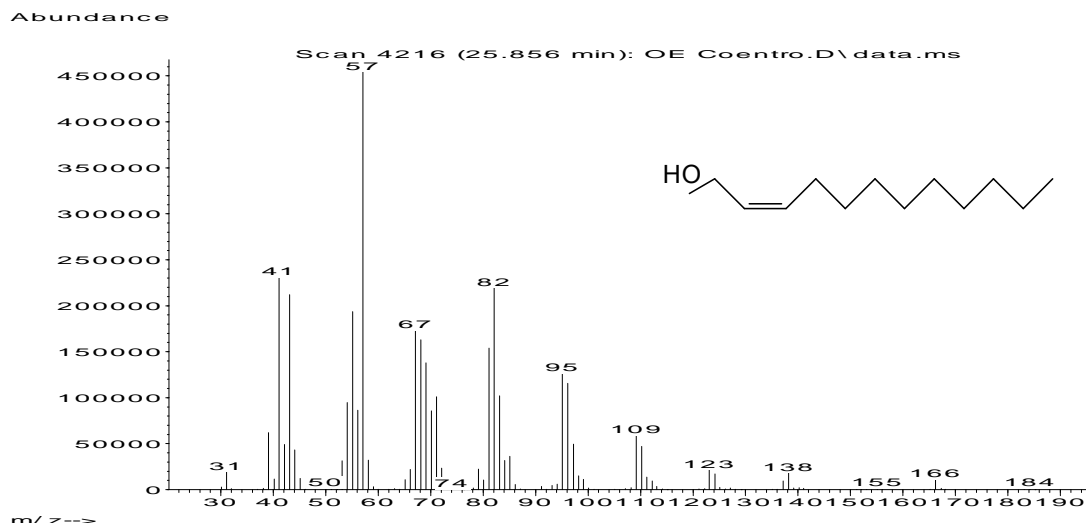


FIGURA 11: Espectro de massas do 2Z-dodecenol ($C_{12}H_{22}O$; $M = 184$).

5.2 - Fracionamento do Óleo Essencial:

Através de resultados preliminares de ensaios microbiológicos verificou-se que apenas OE exercia forte inibição sobre as diferentes espécies de *Candida* e por esse motivo prosseguiu-se com o fracionamento do OE.

O OE foi fracionado em coluna seca utilizando-se diclorometano como eluente, selecionado pelo fato deste apresentar melhor separação dos compostos por CCD, originando 7 frações que foram analisadas por CCD e CG-EM, seguido de avaliação de

atividade antimicrobiana. Na tabela 2 estão apresentados as massas e rendimentos de cada fração do OE.

Tabela 2: Massas e rendimentos das FOE obtidas por coluna seca.

FRAÇÃO	MASSA (mg)	Rendimento (%)
FOE 1	84,3	17
FOE 2	49,5	10
FOE 3	21,6	4
FOE 4	82,4	16
FOE 5	164,8	33
FOE 6	50,9	10
FOE 7	40,9	8
TOTAL	494,4	98

5.2.1- Análise das Frações de Óleo Essencial por CCD:

Na figura 12 está apresentada a cromatoplaça do OE e das frações obtidas por coluna seca, onde se pode avaliar que o fracionamento foi eficiente.

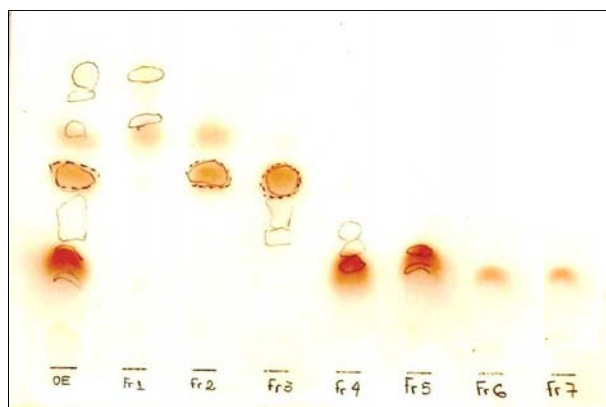


FIGURA 12: CCD do OE e FOE obtidos a partir da coluna seca eluída com diclorometano e revelada com solução de anisaldeído.

5.2.2 - Avaliação da composição química das Frações do OE por CG-EM:

De modo análogo ao OE, os principais compostos presentes nas sete frações obtidas em coluna seca foram identificados por CG-EM e estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3- Principais compostos identificados no OE e nas FOE de *C. sativum*.

COMPOSTO	t _R min	M	% Relativa dos Compostos							
			OE	FOE 1	FOE 2	FOE 3	FOE 4	FOE 5	FOE 6	FOE 7
2-hexenal	3,73	98	0,44	-	-	2,62	-	-	0,36	2,76
3-hexenol	3,82	100	10,34	-	-	-	0,69	10,49	16,29	2,93
2-hexenol	3,96	100	3,82	-	-	-	0,38	4,37	6,22	3,38
n-decanal	14,78	156	4,76	24,77	24,95	4,42	-	-	-	-
2- decenal	17,19	154	-	-	3,10	15,93	-	-	-	-
2E-decenol	17,59	156	18,05	-	-	-	30,12	35,04	-	6,73
1-decanol	17,75	158	24,17	2,16	-	-	11,41	22,42	54,78	1,42
n- dodecanal	18,99	184	-	2,85	1,86	-	-	-	-	-
1-undecanol	21,77	172	-	-	-	-	0,58	1,10	1,08	14,98
tridecanal	23,29	198	3,02	29,26	14,43	2,38	-	-	-	-
2-dodecenal	25,53	182	2,88	0,64	14,89	30,41	-	-	-	-
2Z- dodecenol	25,86	184	17,55	-	-	-	39,88	20,71	6,15	-
tetradecanal	31,17	212	0,86	13,04	3,33	0,51	-	-	-	2,53
2E-etradecenol	33,47	212	3,10	-	26,28	27,00	8,30	2,94		

Tempo de retenção (t_R), massa molar (M) porcentagem relativa em área (%).

Na tabela 4 estão apresentadas as porcentagens relativas em área dos álcoois e aldeídos presentes no OE e nas frações do óleo essencial.

Tabela 4- Porcentagem relativa (%) de álcoois e aldeídos na constituição do Óleo essencial e Frações o Óleo Essencial de *C. sativum*.

Composto	% Relativa dos Compostos							
	OE	FOE 1	FOE 2	FOE 3	FOE 4	FOE 5	FOE 6	FOE 7
Aldeídos	11,96	69,90	62,56	53,64	-	-	0,36	28,89
Álcoois	77,03	2,16	26,28	27,00	64,00	95,90	83,43	31,97

5.2.3 - Avaliação da composição da FOE 1 por CG-EM:

Os principais constituintes da FOE 1 são os aldeídos: n-decanal, $t_R = 14,79$ min (24,77 %), tridecanal $t_R = 23,27$ min (29,26 %) e tetradecanal $t_R = 31,20$ min (13,04 %) apresentados na figura 13.

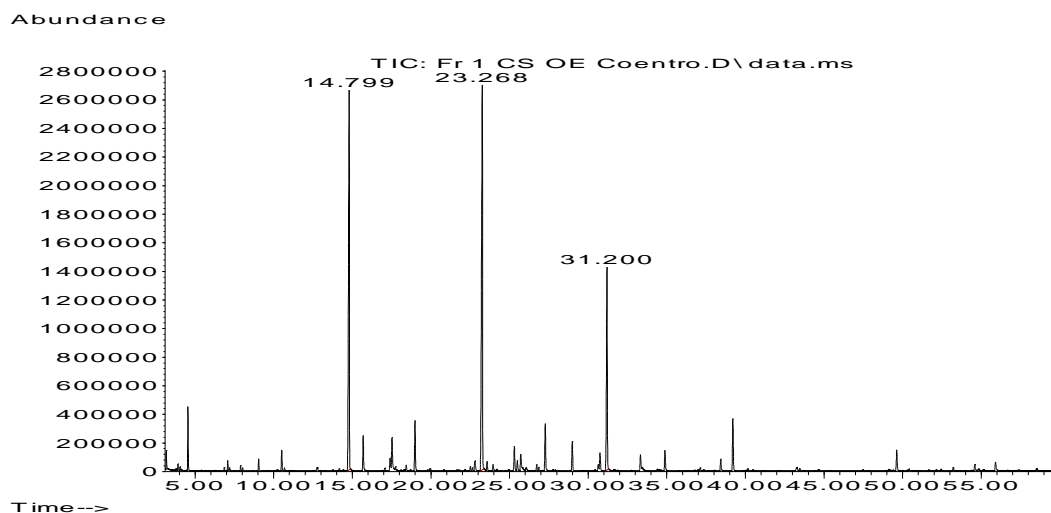


FIGURA 13- Cromatograma da FOE 1 de *C. sativum*.

5.2.4 - Avaliação da composição da FOE 2 por CG-EM:

Dentre os principais constituintes da FOE 2 destacamos o n-decanal $t_R = 14,89$ min (24,95 %), tridecanal $t_R = 23,29$ min (14,43 %) e 2-dodecenal $t_R = 25,62$ min (14,89 %) e 2E-tetradecenol $t_R = 33,47$ min (26,28 %) apresentados na figura 14.

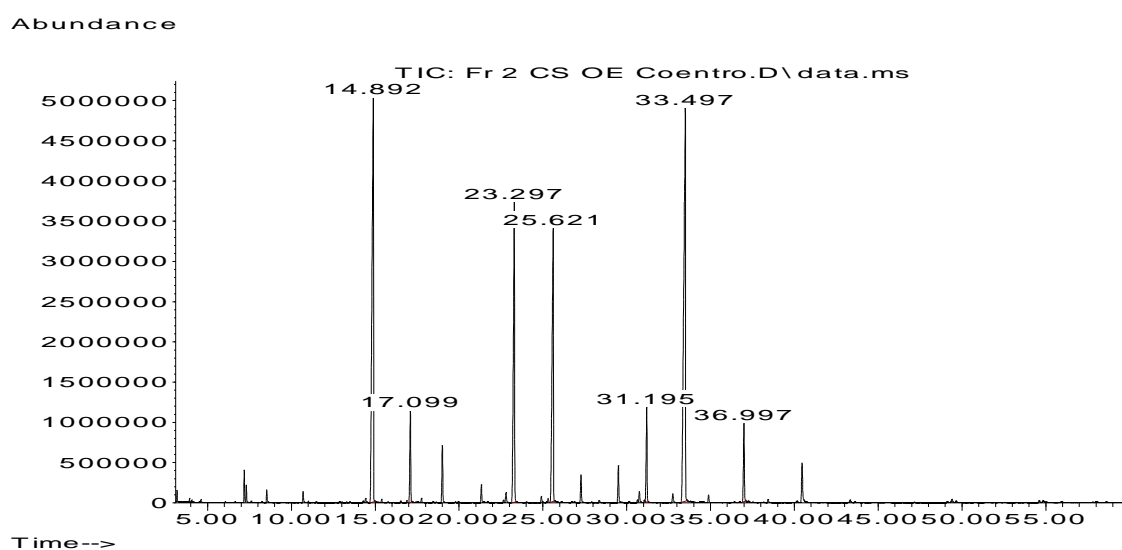


FIGURA 14- Cromatograma da FOE 2 de *C. sativum*.

5.2.5 - Avaliação da composição da FOE 3 por CG-EM:

Na Fração 3 detectou-se a predominância dos compostos: 2-decenal $t_R = 17,19$ min (15,93 %), 2-dodecenal $t_R = 25,69$ min (30,41 %) e 2E-tetradecenol $t_R = 33,47$ min (27,00 %) apresentados na figura 15.

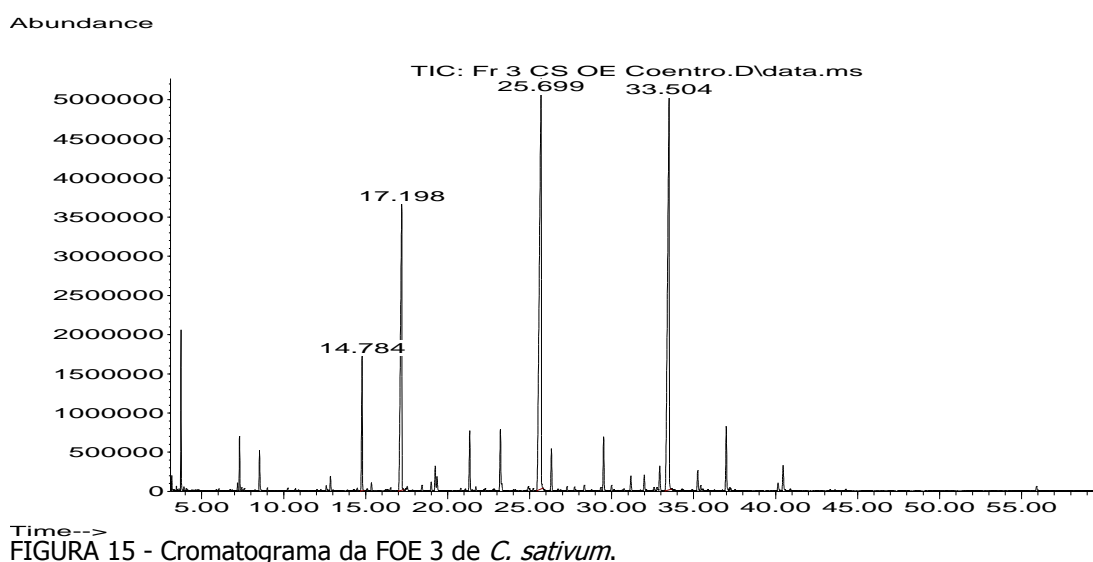


FIGURA 15 - Cromatograma da FOE 3 de *C. sativum*.

5.2.6 - Avaliação da composição da FOE 4 por CG-EM:

Os compostos majoritários desta fração são 2E-decenol $t_R = 17,59$ min (30,12 %), 1-decanol $t_R = 17,75$ min (11,41 %), 2Z-dodecenol $t_R = 25,86$ min (39,88 %) e 2E-tetradecenol $t_R = 33,47$ min (8,30 %) apresentados na figura 16.

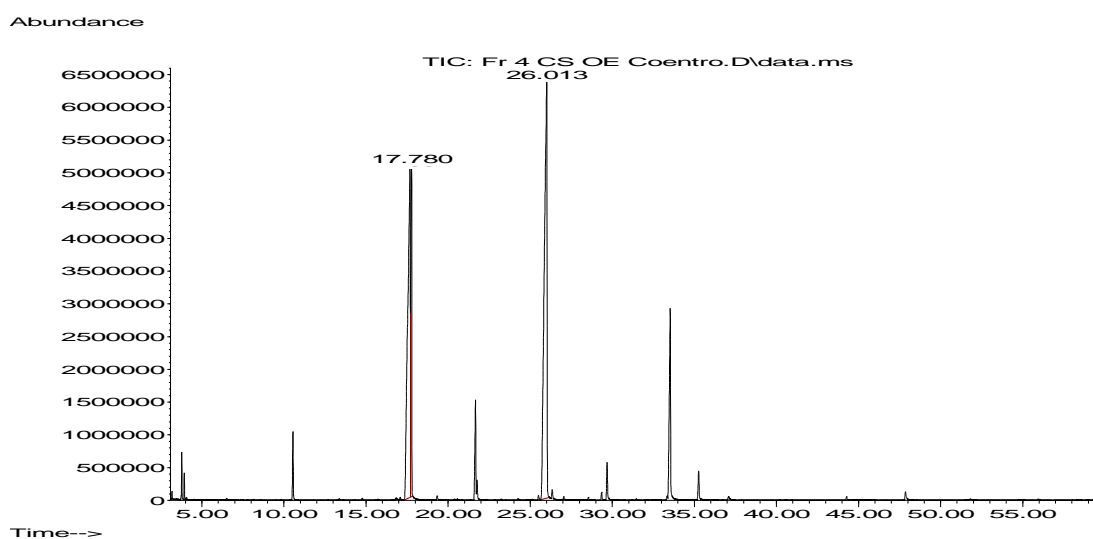


FIGURA 16- Cromatograma da FOE 4 de *C. sativum*.

5.2.7 - Avaliação da composição da FOE 5 por CG-EM:

Destaca-se entre os álcoois: 3-hexenol $t_R = 3,82$ min (10,49 %), 2E-decenol $t_R = 17,59$ min (35,04 %), 1-decanol $t_R = 17,75$ min (22,42 %), Z-2-dodecenol $t_R = 25,86$ min (20,71 %) e 2E-tetradecenol $t_R = 33,47$ min (2,94 %). Na figura 17 está apresentado a Cromatograma da FOE 5.

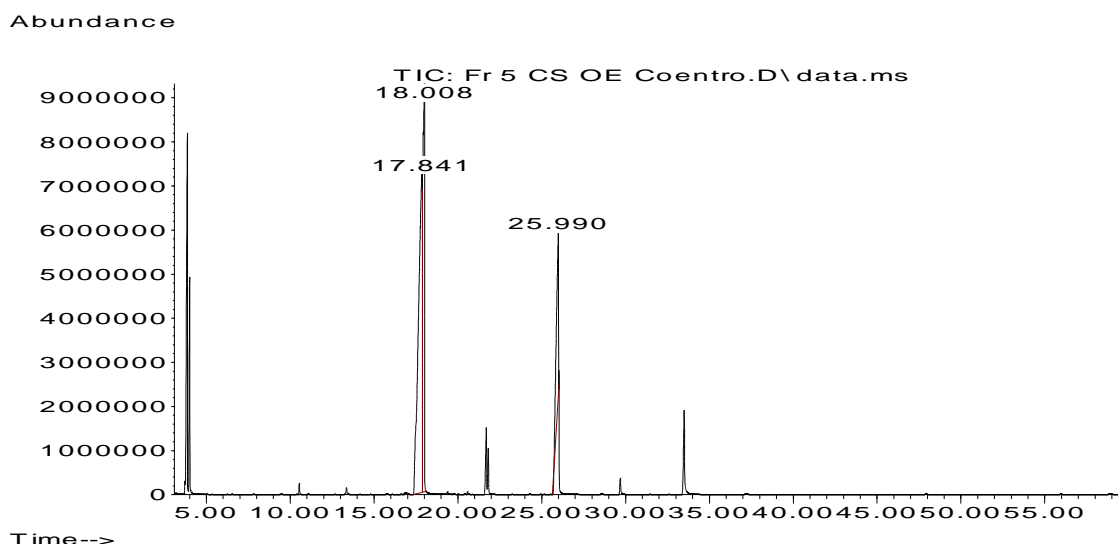


FIGURA 17- Cromatograma da FOE 5 de *C. sativum*.

5.2.8 - Avaliação da composição da FOE 6 por CG-EM:

Ocorre a predominância de álcoois: 3-hexenol $t_R = 3,82$ min (16,29 %) e 1-decanol $t_R = 17,75$ min (54,78 %), os quais estão representados no Cromatograma da figura 18.

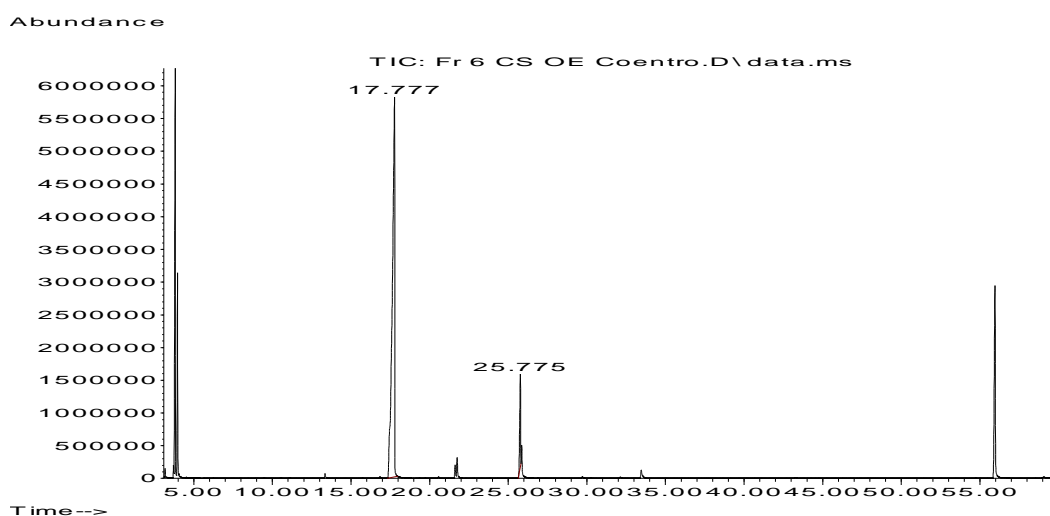


FIGURA 18- Cromatograma da FOE 6 de *C. sativum*.

5.2.9 - Avaliação da composição da FOE 7 por CG-EM:

Na FOE 7 ocorre a presença majoritária dos alcoóis: 1-undecanol $t_R = 21,72$ min (14,98 %) e 2-decenol $t_R = 17,54$ min (6,73 %), conforme observado na figura 19.

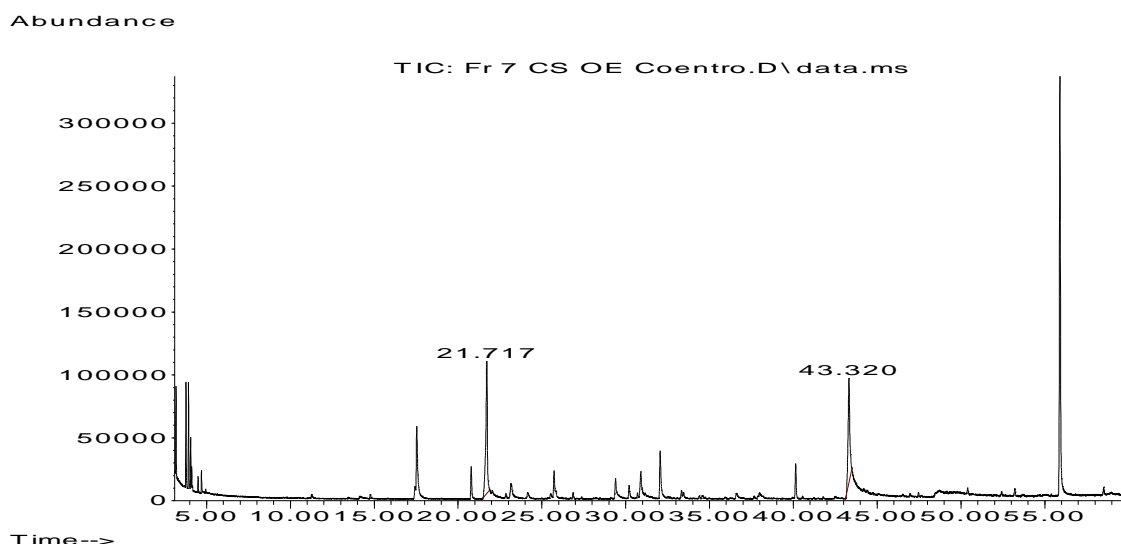


FIGURA 19- Cromatograma da FOE 7 de *C. sativum*.

5.3-Obtenção do EHE e EHA de *C. sativum*:

Para obtenção dos extratos hexânico e hidroalcoólico, as folhas frescas de *C. sativum* foram secas e moídas, obtendo-se aproximadamente 8 % de massa seca, representando 92 % de umidade.

A partir de 10 g das folhas secas e moídas de *C. sativum* foram obtidos 0,43g do EHE e 2,34 g do EHA. Estes dados representam rendimentos de 4,3 % e 23,4 % para o EHE e EHA, respectivamente.

Após os resultados dos ensaios microbiológicos verificou-se que apenas o OE apresentava melhor atividade anti-candida, o que nos motivou a dar prioridade para o fracionamento do OE conforme descrito anteriormente e os estudos químicos com os extratos foram suspensos.

5.3.1-Análise comparativa do OE e extratos por CCD:

Os OE, EHE e EHA obtidos a partir das folhas de *C. sativum* foram analisados por CCD em diferentes eluentes com o objetivo de selecionar um eluente que produzisse uma boa separação dos componentes.

Na figura 20 (A) podemos verificar que as amostras do OE e EHE eluídas com hexano:acetato etila (90:10 v/v) apresentaram uma boa separação dos compostos, enquanto que para o EHA os compostos ficaram retidos no ponto de aplicação.

Na placa (B), onde se utilizou como eluente clorofórmio: metanol (80:20 v/v) observou-se uma melhor separação dos compostos presentes no EHA, entretanto este eluente foi impróprio para análise do OE e EHE.

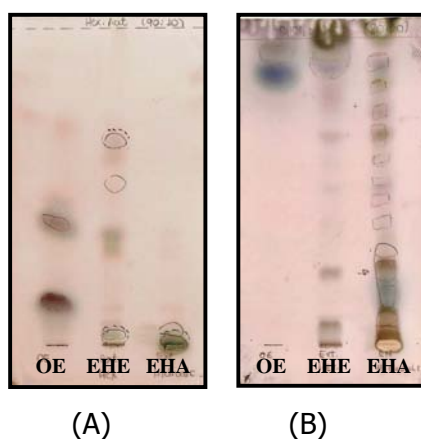


FIGURA 20: CCD do OE, EHE e EHA eluídas com hexano acetato etila (90:10) (A); e Clorofórmio: metanol (80:20) (B), ambas reveladas com anisaldeído.

5.4- Atividade antimicrobiana de *C. sativum*:

Conforme descrito anteriormente, o OE, EHE e EHA foram testados quanto à atividade antimicrobiana frente à diferentes espécies da levedura *Candida*.

Os resultados de MIC ($\mu\text{g/mL}$) estão apresentados na Tabela 5. De acordo com os resultados verificamos que o OE de *C. sativum* apresentou atividade contra a maioria das espécies de *Candida* estudadas, com exceção de *C. tropicalis* CBS 94. Tal atividade

variou de 125 µg/mL (para *C. parapsilosis* CBS 604) a 500 µg/mL (para *C. albicans* CBS 562).

O EHE e o EHA foram capazes de inibir apenas *C. parapsilosis* CBS 604. Não foi verificada inibição para o EHE e o EHA para as demais espécies, na faixa de concentração investigada.

Tabela 5- Atividade antimicrobiana dos OE, EHE e EHA de *C. sativum* frente a diferentes espécies de *Candida*.

	MIC (µg/mL)				
	OE	EHE	EHA	Nistatina	Fluconazol
<i>C. albicans</i> CBS 562	500	*	*	2	63
<i>C. krusei</i> CBS 573	250	*	*	0,5	15
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	125	250	250	8	7
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	250	*	*	1	7
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	*	*	*	16	125

* MIC >1000 µg/mL

A comparação dos resultados de atividade anti-*Candida* de *C. sativum* com a de antibióticos padrões, mostra que os mesmos apresentam inibição a MICs consideravelmente inferiores.

Quando se compara a atividade de produtos naturais com a de antibióticos padrões, não existe ainda um consenso sobre o nível de inibição aceitável, sendo que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram como resultados satisfatórios àqueles com níveis de inibição superior. Duarte *et al.* (2005) propuseram com base no trabalho de Aligianis *et al.* (2001), uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição – MIC até 500 µg/mL; inibição moderada - MIC entre 600 e 1500 µg/mL e com fraca inibição- MIC acima de 1500 µg/mL.

Assim, baseando-se na classificação proposta por de Duarte *et al.* (2005) podemos afirmar que o óleo essencial de *C. sativum* apresentou forte inibição e amplo espectro

antimicrobiano frente às espécies de *Candida*, sendo assim escolhido para os testes de fracionamento.

Os resultados de atividade das frações do óleo essencial de *C. sativum* estão apresentados na Tabela 6. Devido à massa insuficiente das FOE 3 e FOE 7, as mesmas não foram testadas.

Tabela 6- Atividade antimicrobiana das FOE de *C. sativum* frente a diferentes espécies De *Candida*.

	MIC (µg/mL)						
	FOE 1	FOE 2	FOE 4	FOE 5	FOE 6	Nistatina	Fluconazol
<i>C. albicans</i> CBS 562	*	1000	31	63	31	2	63
<i>C. krusei</i> CBS 573	*	125	63	250	63	0,5	15
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	31	1000	7	10	7	8	7
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	*	500	7	31	15	1	7
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	*	*	63	125	63	16	125

* MIC >1000 µg/mL

6 – DISCUSSÃO:

Em nosso trabalho obtivemos o óleo essencial a partir das folhas frescas de *C. sativum* e os extratos hexânico e hidroalcoólico a partir das folhas secas e moídas.

Esse material vegetal foi submetido aos ensaios de atividade antimicrobiana frente as diferentes espécies de *Candida* e demonstraram que os extratos hexânico e hidroalcoólico não apresentaram atividade antimicrobiana, enquanto o óleo essencial mostrou-se ativo para todas as linhagens avaliadas.

Na análise de CCD do óleo essencial foi utilizado como eluente o diclorometano por apresentar uma melhor separação dos compostos sendo utilizado novamente como eluente no fracionamento do OE por coluna seca.

O óleo essencial por apresentar melhor atividade anti-candida foi fracionado em coluna seca originando sete frações, as quais foram submetidas à análise por CG-EM e aos ensaios de atividade antimicrobiana.

Nos ensaios de atividade antimicrobiana a fração 1 apresentou forte inibição apenas contra a *C. parapsilosis* e inatividade para as demais espécies de *Candida* estudadas, enquanto a fração 2 apresentou uma inibição moderada frente as diferentes espécies de *Candida*.

Os resultados mostram que as FOE 4, 5 e 6 apresentaram as melhores MICs, com forte inibição. Considerando a abrangência sobre as diferentes espécies de *Candida* as mesmas apresentaram um amplo espectro antimicrobiano, com MICs variando entre 7 e 250 µg/mL. Comparando os valores de MIC das frações 4, 5 e 6 com os antibióticos padrões verificamos que os mesmos apresentaram inibição similar para *C. albicans* CBS 562, *C. parapsilosis* CBS 604, *C. dubliniensis* CBS 7987 e *C. tropicalis*, destacando-se assim as frações 4 e 6 com valores de MICs de 7 a 63 µg/mL, enquanto os valores de MICs obtidos para o OE variaram de 125 a 500 µg/mL.

Na análise do óleo essencial por CG-EM evidenciou-se a presença de álcoois e aldeídos de cadeia linear como: 1-decanol (24,17 %), 2E-decenol (18,05 %), 2Z-dodecenol (17,55 %), 3-hexenol (10,34 %) seguido de n-decanal, 2-hexenol, tridecanal, 2E-dodecenal e 2-hexenal.

Kubo (2004) detectou no OE das folhas frescas de *C. sativum* os seguintes constituintes: decanal, 2E-decenal, 2E-dodecenal, nonano, linalol, tetradecanol, 2E-undecenol, dodecanal, 2E-tridecenal, octanal, undecanal, nonanal e 2E-hexenal.

Segundo Delaquis *et al.* (2002) o óleo essencial das folhas de *Coriandrum sativum* possui uma mistura heterogênea de constituintes como álcool, aldeídos, alcanos e terpenos, onde identificou como compostos majoritários do OE: linalol (25 %), 2E-decenal (20,2 %), decanal (8,4 %), 2E-decenol (7,9 %), 1-decanol (3,9 %), alfa-pinene (2,7 %), nonano (2,5 %), canfora (1,9 %), D-limoneno (1,8 %), carvona (1,2 %), alfa-terpineno (0,9 %), octanol e 3-hexenol (0,3 %).

Quinze compostos voláteis foram extraídos das folhas e raízes de uma espécie chinesa de *C. sativum*, sendo os majoritários: 2E-tridecenal (19,29 %), 1-decanol (16,52 %), 2E-dodecenal (13,99 %), 2E-decenol (13,71 %), decanal (9,12 %), 2-decenal (8,41 %), 8E-dodecenil (5,63 %), 3-hexenol (1,54 %), dodecanal (1,05 %), 1-hexenol (0,29 %), hexadecane (0,59 %), 5E-dodecenol (0,65 %) , 2E-decenol (0,35 %) (Deng, 2003).

Nossos resultados químicos estão de acordo com Delaquis (2002), Deng (2003) e Kubo (2004), entretanto estes citam vários terpenos como compostos majoritários, os quais não foram observados em nossas análises. E com relação aos demais compostos químicos encontrados em nosso estudo, os mesmos foram reportados por estes autores, no entanto em menor quantidade.

Os compostos majoritários encontrados no OE estudado são álcoois de cadeia linear (C₆ a C₁₄) perfazendo cerca de 77 % enquanto os aldeídos correspondem a 11 % de sua constituição.

As frações mais apolares (fração 1 a 3) obtidas em coluna seca apresentaram maior teor de aldeídos em sua constituição, enquanto as frações mais polares (4 a 6) são enriquecidas em álcoois.

A fração 4 é constituída por 64% de álcoois enquanto na fração 5 observa-se 95,9 % desses compostos, destacando-se o 2E-decenol, seguido de 1-decanol , 2Z-dodecenol e a fração 6 apresenta 83,43% de álcoois de cadeia longa com predominância do 1-decanol (54,78 %). Observamos que a porcentagem relativa de álcoois presente nas frações mais polares (FOE 4, 5 e 6) são superiores às detectadas no OE bruto, demonstrando a particularidade química de cada fração associada aos diferentes espectros

antimicrobianos, sendo que Delaquis (2001) relata que na medida em que a massa molecular dos compostos alcoólicos aumenta ocorre concomitantemente maior inibição antimicrobiana.

Delaquis *et al.* (2002) relataram que o óleo essencial bruto de *C. sativum* apresentou atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* devido à presença álcoois e aldeídos de cadeia longa (C₆ -C₁₀). Entretanto após fracionamento apenas uma das 11 frações apresentou atividade, sugerindo que o potencial de inibição e o espectro de ação antimicrobiana das frações diferem e muitas vezes excedem os valores de referência do óleo essencial bruto, sugerindo uma complexa interação entre compostos individuais levando a uma potente atividade inibidora.

Segundo Kubo (2003) os álcoois atravessam a membrana plasmática através de difusão passiva ou canais iônicos. São compostos quimicamente estáveis e não interagem com grupos biologicamente importantes no citosol ou na bicamada lipídica e sua atividade antimicrobiana está relacionada à ação surfactante não-iônica que produz o rompimento físico da membrana fúngica.

Os aldeídos alifáticos alfa e beta insaturados desorganizam e rompem as camadas lipídicas, destruindo as ligações de hidrogênio presentes nas mesmas. Dessa maneira a estrutura celular torna-se comprometida favorecendo a penetração desses compostos que ao atingir a região intracelular reagem com grupos nucleofílicos biologicamente importantes (Kubo, 2001).

Em nosso estudo pudemos confirmar que as frações mais apolares (FOE 1-3) enriquecidas em aldeídos não demonstraram atividade antimicrobiana frente as cinco diferentes espécies de *Candida* testadas, enquanto as frações mais polares (FOE 4-6) com maior concentração de álcoois, apresentaram forte inibição frente as diferentes espécies de *Candida* o que pode ser explicado devido ao rompimento físico das membranas fúngicas, conforme mecanismo de ação sugerido por Kubo (2003).

Devido ao fato do óleo essencial apresentar baixa concentração de aldeídos em contraste a altas concentrações de álcoois (C₆ -C₁₄), sugerimos que os mesmos são responsáveis pela atividade antimicrobiana frente as diferentes espécies de *Candida*, uma vez que as frações mais ativas apresentam maior teor em álcoois do que o OE bruto.

Num trabalho futuro, tentaremos isolar os compostos majoritários das frações mais polares com objetivo de testá-los individualmente e confirmamos suas atividades.

7 – CONCLUSÕES:

- O óleo essencial de *C. sativum* apresenta atividade antimicrobiana frente a diferentes espécies de *Candida*.
- As análises do OE e FOE por CG-EM revelaram a presença de álcoois e aldeídos de cadeia linear cuja predominância variaram em cada fração de acordo com a polaridade.
- As frações mais apolares (FOE 1-3) com predominância de aldeídos não exibiram atividades antimicrobianas.
- Enquanto as frações polares (FOE 4-6) enriquecidas com álcoois demonstraram atividades antimicrobianas.
- Constatação que os EHE e EHA de *C. sativum* não apresentaram atividades antimicrobianas.
- Os álcoois de cadeia longa presentes nas frações 4, 5 e 6 provavelmente sejam os responsáveis pela atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS*

Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against Human pathogenic fungi. J Agric Food Chem. 1998; 46: 1739-45.

Adams RP. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry, Allured Publishing Corporation: Illinois, 4 th Ed. 2007.

Al-Jedah JH, Ali MZ, Robinson RK. The inhibitory action of spices against pathogens that might be capable of growth in a fish sauce (mehiawah) from the Middle East. Int J Food Microbiol. 2000; 57: 129-33.

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. Introductory mycology. New York: John Wiley & Sons; 1996.

Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J Agric Food Chem. 2001; 49(9): 4168-70.

Alves SH, Silva GM, Scopel PA, Oliveira LTO, Costa JM, Milan EP *et al.* Isolamento de *Candida dubliniensis* da mucosa oral de um paciente com SIDA, no Rio Grande do Sul. Rev AMRIGS. 2000; 44(3/4): 185-7.

Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra –oral distribution of *Candida albican* in man. Arch Oral Biol. 1980;25:1-10.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos (ABIFITO). Sistema de Informação sobre as estatísticas do mercado de plantas medicinais, 2007 [acesso 2007 Dez 5]. Disponível em: <http://www.abifito.org.br>.

Bandoni AL, Mizrahi I, Juarez MA. Composition and quality of the essential oil of coriander (*Coriander sativum* L.) from Argentina. J Essent Oil Res. 1998; 10: 581-4.

Barros LM. Ocorrência de *C.albicans* e *C.dubliniensis* em sítios subgengivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAP e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/ FOP; 2005.

Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. Rev Odontol Univ São Paulo. 1999; 13(4): 343-8.

Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsfor DSR. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts form dental samples. J Clin Microbiol. 1995; 33(11): 3025-3027.

Blac JG. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 829p.

Bonjar GHS, Aghighi S, Nik AK. Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of South East Regions of Iran. J Biol Sci. 2004; 4(3): 405-12.

Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz J Biol Res. 2000; 33: 179-89.

Calixto, J.B. Desenvolvimento de medicamentos: Ensaios pré-clínicos. Médicos. 1998; Set/ Out.: 22-25.

Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33(5): 437-42.

Cantore PL, Iacobelli NS, Marco A, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L, and *Foeniculum vulgare* Miller Var. vulgare (Miller) essential oils. J Agric Food Chem. 2004; 52: 7862-6.

Cecanho R, Koo H, Rosalen PLJA, Park YK, Cury JA. Efeito do extrato hidroetanólico de *Mikania laevigata* sobre o crescimento bacteriano e a produção de glucanos por *Streptococcus* do grupo *mutans*. In: Anais da 14ª Reunião Anual da Federação da Sociedade de Biologia Experimental, 25-28 de agosto de 1999. Caxambu (MG). Caxambu: FSBE; 1999. v.14, p.290 [Resumo, 12.095].

Cecanho R, Koo H, Rosalen PLJA, Pierobon CN, Park YK, Rehder VLG *et al.* Atividades antimicrobianas de extratos de plantas medicinais sobre patógenos bucais. In: Anais do 15º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 14-17 de outubro de 1998. Águas de Lindóia. Águas de Lindóia; 1998.

Chao SC, Young DG, Oberg CJ. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. J Essent Oil Res. 2000; 12(5): 639-49.

Chaudhry NMA, Tariq P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. Pak J Pharm Sci. 2006; 19(3): 214-8.

Chavasco JK, Paula CR, Hirota MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W *et al.* Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesion of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2006; 48(1): 21-26

Chen Y. Method of treating *Candida* and *Cryptococcus* fungal infections by administering gentian, U.S. United States patent US 5837254 A. 1996.

Chithra V, Leelamma S. *Coriandrum sativum*-effect on lipid metabolism in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. J Ethnopharmacol. 2000; 71: 457-63.

Chithra V, Leelamma S. Hypolipidemic effect of coriander seed (*Coriandrum sativum*); mechanism of action. Plant Foods Hum Nutr. 1997; 51(2): 167-72.

Cragg GM, Newman DJ. Discovery and development of antineoplastic agents from natural source. Cancer Invest. 1999; 17(2): 153-63.

De Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. Infect. Immun. 2000; 68(6): 3172-3179.

Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. Int J Food Microbiol. 2002; 74: 101-9.

Deng C, Song G, Hu Yaiming, Zhang X. Determination of the volatile constituents of Chinese *Coriandrum sativum* L. by gas chromatography- mass spectrometry with solid-phase microextraction. Chromatographia. 2003; 57(5/6): 357-61.

Duarte MCT, Figueira GM, Delarmelina C, Sartoratto A. Investigação da atividade do óleo essencial de suas variedades de *Coriandrum sativum* contra microrganismos envolvidos com patologias dérmicas. Hortic Bras. 2007; 25(1 Supl): 3329-32.

Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2005; 97: 305-11.

Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J Food Prot. 2001; 64(7): 1019-24.

Emamghoreishi M, Heidari-Hamedani G. Sedative-hypnotic activity of extracts and essential oil of coriander seeds. Iran J Med Sci. 2006; 31(1): 22-7.

Emamghoreishi M, Khasaki M, Aazam MF. *Coriandrum sativum*: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze. J Ethnopharmacol. 2005; 96: 365-70.

Fan X, Sokorai KJB. Changes in volatile compounds of g-irradiated fresh cilantro leaves during cold storage. J Agric Food Chem. 2002; 50: 7622-6.

Fellows LE. Pharmaceuticals from tradicional medicinal plants and others: future prospects In: Coombs JD, editor. New drugs from natural sources. London: IBC Technical Services; 1995.

Fisher JF. Urinary tract infections due to *Candida albicans*. Rev Infect Dis. 1982; 4: 1107-18.

Galli A, Franzetti L, Briguglio D. Attività antimicrobica in vitro di oli essenziali ed estratti di spezie di uso alimentare. Ind Alimentari. 1985: 463-6.

Gelfand MS, Mcgee ZA, Kaiser AB, Tally FP, Moses J. Candidal meningitis following bacterial meningitis. South Med J. 1990; 83(5): 567-70.

Gray AM, Flat PR. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander). Br J Nutr. 1999; 81(3): 203-9.

Hagihara Y. et al. Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. Arch Oral Biol. 1988; 33(8): 617-619.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea Tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. J Antimicrob Chemother. 1998; 42: 591-5.

Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev. 1995; 8: 462-78.

Höfling JF, Rosa EAR. Main technique employed in the molecular epidemiology of *Candida* species. Alpe Adria Microbiol J. 1999; 8(1): 5-23.

Höfling JF, Rosa EA, Pereira CV, Boriollo MF, Rodrigues JA. Differentiation and numerical analysis of oral yeasts based on SDS-PAGE profiles. Influence of the culture media on the whole-cell protein extracts. *Braz J Biol.* 2001; 61(3): 507-16.

Hoog GS, Guarro J, Genô J, Figueiras MJ. *Atlas of clinical Fungi*. 2.ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000. 1126p.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 2001; 147(8): 1997-2005.

Hulin V, Mathot AG, Mafart P, Dufossé L. Dufossé, Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sci Aliments.* 1998; 18(6): 563-82.

Jabra-Rizk MA, Falkler JR, Merz WG. New assay for measuring cell surface hydrophobicities of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Clin Diag Lab Immunol.* 2001b; 8(3): 585-7.

Jabra-Rizk MA, Ferreira SM, Sabet M, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesions. *J Clin Microbiol.* 2001a; 39(12): 4520-2.

Jansen AM, Scheffer JJC, Baerheim-Svendeaen A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species. *Pharmazie.* 1987; 45: 70.

Khallil ARM. Phytofungitoxic properties in the aqueous extracts of some plants. *Pak J Pharm Sci.* 2001; 4(4): 392-4.

Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K. Frequency, intensity, species and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 2246-54.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Diagnóstico microbiológico: textos e atlas coloridos. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001. 1465p.

Kubo I, Fujita KI. Naturally occurring anti-Salmonella agents. J Agric Food Chem. 2001; 49: 5750-4.

Kubo I, Fujita KI, Kubo A, Hihei KI, Lunde CS. Modes of antifungal action of (2E)-alkenals against *Saccharomyces cerevisiae*. J Agric Food Chem. 2003; 51(14): 3951-7.

Kubo I, Fujita KI, Kubo A, Hihei KI, Ogura T. Antibacterial activity of Coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. J Agric Food Chem. 2004; 52(11): 3329-32.

Lacaz CS. Candidiases. São Paulo: EPU-EDUSP; 1980. 190p.

Lal AAS, Tkumar PBM, Pillai KS. Hypolipidemic effect of *Coriandrum sativum* L. intriton-induced hyperlipidemic rats. Indian J Exp Biol. 2004; 42: 909-12.

Lamkim MS, Oppenheim FG. Structural features of salivary function. Crit Rev Oral Biol Med. 1993; 4(3/4): 251-259.

Lee H, Kim S, Park B, Ahn Y. Composition useful for the treatment of bacterial infections e.g. athlete's foot comprises plant extracts or their compounds. United States patent WO2003035093-A1. 2003.

Lentz DL, Clark AM, Hufford CD, Meurer-Grimes B, Passreiter CM, Cordero J *et al.* Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. J Ethnopharmacol. 1998; 63: 253-63.

Lewis DA, Hanson PJ. Anti-ulcer of plant origin. Prog Med Chem. 1991; 28: 201-31.

Lino CM, Baeta L, Pena AS, Silveira IN. Determination of ochratoxin A in coriander (*Coriandrum sativum* L.) by HPLC/ fluorescence detection. Quim Nova. 2006; 29(3): 436-9.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002. v.1, 227p.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Microbiologia de Brock. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall; 2004. 609p.

Mardegan RC. Enzimagem e genotipagem de isolados de *C.albicans* da cavidade oral de crianças cáries ativas e livres de cáries [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/ FOP; 2003.

Martínez MJ, Betancourt J, Alonso-González N, Jauregui A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. J Ethnopharmacol. 1996; 52(3): 171-4.

McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. J Clin Microbiol. 1999; 37: 417-21.

Melo EA, Mancini Filho J, Guerra NB, Maciel GR. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). Ciênc Tecnol Aliment. 2003; 23 Supl: 195-9.

Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T *et al.* Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus- positive patients: Persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. J Clin Microbiol. 1994; 32(4): 1115-8.

Mondal S, Kolhapure SA. Evaluation of the antimicrobial efficacy and safety of PureHands herbal hand sanitizer in hand hygiene and on inanimate objects. Antiseptic. 2004; 101(2): 55-7.

Moreira ACA, Falcao AFP, Andrade AP, Souza ER. Isolation of *Candida parapsilosis* in a patient with clinic diagnosis of chronic atrophic candidiasis. Rev Cienc Med Biol. 2002; 1(1): 124-8.

National Center for Biotechnology Information. The NCBI Entrez Taxonomy Homepage. [acesso 2007 Dez 7]. Disponível em: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Taxonomy&cmd=search&term=>

NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: norma aprovada. 2.ed. Pennsylvania; 2002. NCCLS document M27-A2, v.22, n.15, 51p.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque past and recent concerns. J Dent. 1998; 26: 200-304.

Odds FC. Candida and candidosis. 2.ed. London: Baillière Tindall; 1998.

Okasaka E. Factors predisposing to oral yeasts infections. Acta Odontol Scand. 1990; 48(1): 71-4.

Ollila P, Niemelä M, Uhari M, Larmas M. Risk factors for colonization of salivary lactobacilli and *Candida* in children. Acta Odontol Scand. 1997; 55(1): 9-13.

Otoom SA, Al-Safi SA, Kerem ZK, Alkofani A. The use of Medicinal Herbs by diabetic Jordanian patients. J Herb Pharmacother. 2006; 6(2): 31-41.

Persons D, Laughlin M, Tanner D, Perfect J, Gockerman JP, Hathorn JW. Fluconazole and *Candida krusei* fungemia. N Engl J Med. 1991; 325(18): 1351.

Plummer N. New antimicrobial compositions which colonise the small intestine – contain non-pathogenic microorganisms and *Allium* plant material; for treating gastrointestinal and urogenital disease. United States patent EP554319-A. 1992.

Ramadan MF, Mörsel JT. Oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit-seeds. Eur Food Res Technol. 2002; 215: 204-9.

Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Quim Nova. 2006; 29(4): 755-60.

Ramirez-Amador V, Silverman Jr S, Mayer P, Tyler M, Quivey J. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod. 1997; 84(2): 149-53.

Ravikumar KL, Kollapure SA. Evaluation of the antimicrobial efficacy and satefety of PureHands as a hand sanitizer: a prospective, double blind, randomized and placebo-controlled phase III clinical trial. Indian J Clin Pract. 2005; 15(10): 19-27.

Rippon JW. Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3.ed. Philadelphia: Saunders; 1988. p.482.

Rodrigues GMC, Capobianco TD, Atique TSC, Conceição LM, Fraga VP, Giannini MJSM *et al*. Cândida sp. In the oral cavities of HIV-1 serum positive and serum negative individuals from the Northeastern São Paulo State region, Brazil. Rev Panam Infectol. 2007; 9(3): 26-31.

Saeed S, Tariq P. Antibacterial activities of *Embllica Officinalis* and *Coriandrum sativum* against gram negative urinary pathogens. Pak J Pharm Sci. 2007; 20(1): 32-5.

Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE (Santa Catarina). Sistema de Informação sobre Oportunidades e Negócios de fitoterápicos, 2007 [acesso 2007 Dez 5]. Disponível em: <http://www.sebrae/sc.org.br/oportunidadesenegocios>.

Shale TL, Stirk WA, Van Staden J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. J Ethopharmacol. 1999; 67: 347-54.

Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(1): 40-79.

Simões CMO, organizador. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2005. 1102p.

Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rod and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1989; 3: 47-52.

Slots J, Taubman MA. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. 1992. St. Louis, Missouri. Mosby Year Book.

Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN, Barbosa Filho JM. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. Braz Arch Biol Technol. 2005; 48(4): 549-58.

Souza LB, Pinto LP, Medeiros AMC, Araújo Jr RF, Mesquita OJX. Manifestações orais em pacientes com AIDS em uma população brasileira. Pesqui Odontol Bras. 2000; 14(1): 79-85.

Spolidorio DMP, Spolidorio LC, Barbeiro RH, Höfling JF, Bernardo WLC, Pavan S. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Candida* sp e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia. Pesqui Odontol Bras. 2001; 15(4): 354-8.

Strausbaugh LJ, Sewwl DL, Ward TT, Pfaller MA, Heitzman T, Tjoelker R. High frequency of yeast carriage on hand of hospital personnel. J Clin Microbiol. 1994; 32(9): 2299-300.

Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. Microbiologia Ilustrada. Porto Alegre: Artmed; 2004. 531p.

Sullivan DJ, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characterization and identification. J Clin Microbiol. 1998; 36: 329-34.

Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gee S, Pinjon E, McCartan B *et al.* *Candida dubliniensis*: an update. Rev Iberoam Micol. 1999; 16: 72-6.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV- infected individuals. Microbiology. 1995; 141: 1507-21.

Telci I, Toncer OG, Sahbaz N. Yield, essential oil content and composition of *Coriandrum sativum* varieties (var.vulgare Alef and var. microcarpum DC.) grown in two different locations. J Essent Oil Res. 2006; 18: 189-93.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 2005, 8 ed: 894.

Vargas KG, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage and strains of oral species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. J Clin Microbiol. 2002; 40(2): 341-50.

Vejdani R, Shalmani HR, Mir-Fattahi M, Sajed-Nia F, Abdollahi M, Zali MR *et al.* The efficacy of an herbal medicine, carmint, on the relief of abdominal pain and bloating in patients with irritable bowel syndrome: a pilot study. Dig Dis Sci. 2006; 51(8): 1501-7.

Waheed A, Miana GA, Ahmad SI, Khan MA. Clinical investigation of hypoglycemic effect of *Coriandrum sativum* in type-2 (NIDDM) diabetic patients. Pak J Pharmacol. 2006; 23(1): 7-11.

WIKIPEDIA. Sistema de Informação, enciclopédia online [acesso 2007 Dez 20]. Disponível em: <http://www.wapedia.mobi/pt/coentro>.

Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis. 1995; 20: 115-25.

Xu YY, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro susceptibility of *Candida* species to lactoferrin. Med Mycol. 1999; 37(1): 35-41.

ANEXOS

1- LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia de Camada Delgada.
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.
EHA	Extrato Hidroalcoólico de <i>Coriandrum sativum</i> .
EHE	Extrato Hexânico de <i>Corindrum sativum</i> .
FOE	Fração do óleo essencial de <i>Coriandrum sativum</i> .
µg/mL	Microgramas por mililitro.
µL/mL	Microlitro por mililitro.
OE	Óleo essencial.

ANEXOS

2- LISTAS DAS ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>C. sativum</i> (A) em florescimento (B) e folhas (C).	02
Figura 2	Sementes (A), condimentos (B) e raiz (C).	03
Figura 3	Colônia de fungos filamentosos e estrutura de hifas.	05
Figura 4	Bolores e leveduras entre outros microrganismos (A) e levedura em diversos estágios de brotamento (B).	06
Figura 5	Candidíase oral	11
Figura 6	Ilustração do teste de atividade antimicrobiana através do método de microdiluição.	25
Figura 7	CCD do OE eluído com diclorometano e revelado com anisaldeído.	26
Figura 8	Cromatograma de OE obtido de <i>C. sativum</i>	28
Figura 9	Espectro de massas do 2E-decenol	28
Figura 10	Espectro de massas de 1-decanol	29
Figura 11	Espectro de massas de 2Z-dodecenol	29
Figura 12	CCD dos OE e FOE a partir de coluna seca e eluídas com diclorometano.	30
Figura 13	Cromatograma FOE 1.	32
Figura 14	Cromatograma FOE 2.	32
Figura 15	Cromatograma FOE 3.	33
Figura 16	Cromatograma FOE 4.	33
Figura 17	Cromatograma FOE 5.	34
Figura 18	Cromatograma FOE 6.	34
Figura 19	Cromatograma FOE 7.	35

Figura 20	CCD comparativa do OE, EHE e EHA.	36
Tabela 1	Principais constituintes identificados no OE de <i>C. sativum</i> .	27
Tabela 2	Massas e rendimentos das frações do OE.	30
Tabela 3	Principais compostos identificados no OE e nas FOE de <i>C. sativum</i> .	31
Tabela 4	Porcentagem relativa (%) de álcoois e aldeídos na constituição dos OE e FOE.	31
Tabela 5	Atividade antimicrobiana do OE, EHE e EHA frente diferentes espécies de <i>Candida</i> .	37
Tabela 6	Atividade antimicrobiana das FOE frente diferentes espécies de <i>Candida</i> .	38